

X

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service  
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

---

TOME QUATRE-VINGT-SIXIÈME

Janvier-Juin 1954

---

QR

I

A475

v.86

Jan.-June

1954

PER

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

ANNALES

L'INSTITUT PASTEUR

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1954

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## ÉTUDE COMPARATIVE DU DÉVELOPPEMENT ET DU NOMBRE DES BACILLES TUBERCULEUX VIRULENTS DE SURINFECTION DANS LES DIVERS ORGANES DE COBAYES ET DE LAPINS VACCINÉS PAR LE BCG ET DE TÉMOINS NON VACCINÉS

par L. NÈGRE (\*)

(avec la collaboration de M<sup>me</sup> D. ROY-LANGLADE).

(Institut Pasteur.)

Tout un ensemble de recherches effectuées depuis la découverte du bacille de la tuberculose : étude du phénomène de Koch, essais de vaccination par des bacilles tuberculeux peu virulents (von Behring, S. Arloing), vaccination antituberculeuse par le bacille de A. Calmette et C. Guérin, observations faites en médecine vétérinaire par ces deux derniers auteurs et en clinique humaine par A. Marfan, a montré que les hommes et les animaux primo-infectés par un bacille de Koch virulent ou avirulent résistent aux surinfections exogènes spontanées ou artificielles, bien qu'ils se montrent incapables d'empêcher le développement dans leur organisme des bacilles tuberculeux virulents de la primo-infection.

Pour Rist, Kindberg et Rolland [1], cette résistance est déterminée par la destruction des bacilles de surinfection.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.



Dans une autre voie, A. Krause et M. Willis [2] ont mis en évidence le mécanisme qui, chez le cobaye primo-infecté par un bacille peu virulent et devenu allergique, bloque pendant environ quatre semaines les bacilles virulents d'une surinfection d'épreuve, dans les ganglions lymphatiques voisins de la porte d'entrée, alors que chez des cobayes témoins neufs ayant subi la même infection virulente, les bacilles se disséminent quatre jours après dans les différents organes.

A. Boquet [3], qui, avec divers collaborateurs, a longuement étudié cette question, ne nie pas l'existence d'un processus de bactériolyse, mais il pense qu'il ne représente qu'un aspect secondaire des réactions de l'organisme tuberculeux aux surinfections. Pour lui, le phénomène essentiel consiste « dans le blocage temporaire ou définitif des germes virulents d'épreuve et dans la délimitation de plus en plus précoce et de plus en plus étroite du champ de leur action pathogène ».

Par contre, Max Lurie [4] attribue une grande importance à la lyse bactérienne dans les phénomènes d'immunité, mais il pense qu'elle ne s'effectue pas de la même façon dans les divers organes. Des lapins immunisés par des bacilles humains très peu virulents pour ces animaux ont été surinfectés six mois plus tard par inoculation intraveineuse de bacilles bovins virulents. Des lapins non vaccinés ont été éprouvés de la même façon.

Max Lurie a constaté chez ces derniers une multiplication des bacilles virulents dans tous les organes, puis après quatre ou six semaines leur destruction plus ou moins complète dans le foie, la rate et la moelle osseuse, alors qu'ils ne cessent pas d'augmenter en nombre dans les poumons et dans les reins.

Par contre, chez les vaccinés surinfectés, il y a une décroissance immédiate des bacilles de surinfection, particulièrement marquée dans le foie, la rate et la moelle osseuse.

Il ne nous semble pas que le mécanisme de la lyse puisse à lui seul expliquer cette teneur différente des organes en bacilles tuberculeux de surinfection.

La pratique de la vaccination par le BCG montre que, chez des cobayes prémunis par la voie sous-cutanée et chez des lapins vaccinés par la voie intraveineuse, puis soumis à une surinfection virulente par les mêmes voies, les lésions apparaissent en général d'abord dans la rate chez les premiers et dans les poumons chez les seconds, comme cela se produit chez des cobayes et des lapins infectés d'emblée par des bacilles virulents. Elles se manifestent avec un certain retard par rapport aux témoins d'abord dans ces derniers organes, puis ensuite dans les autres. Elles sont toujours beaucoup plus rares que chez les animaux témoins. Ce sont de gros tubercules épars sur le tissu resté sain que Calmette appelait « lésions de résistance ».

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de déterminer, chez des animaux vaccinés par le BCG ou par un autre bacille avirulent, puis surinfectés par des bacilles tuberculeux virulents, la teneur de leurs divers organes en ces germes. Nous n'avons pas, comme l'a fait A. Boquet, étudié la dissémination des bacilles de surinfection par les voies lymphatique et sanguine. Nous nous sommes borné à prélever des fragments d'un poids déterminé des principaux organes de cobayes et de lapins, préalablement vaccinés puis surinfectés par des bacilles virulents, et d'animaux témoins infectés de la même façon, à les ensementer sur des milieux à l'œuf et à procéder à une numération des colonies apparues pour nous rendre compte de la teneur des organes en bacilles virulents et des changements qui peuvent se produire à ce point de vue dans les premières semaines après la surinfection.

Si une inégale répartition des bacilles virulents de surinfection se produit dans les organes dès le début de cette dernière, on serait en droit de penser qu'elle est due plus à un tropisme spécial des bacilles pour certains organes, qu'à leur destruction dans ceux où on n'en trouve pas, surtout s'il ne s'agit que d'un simple retard.

#### TECHNIQUE.

Nous avons employé pour les vaccinations soit le BCG, soit la souche avirulente lisse Béc. que nous avons isolée, il y a de nombreuses années, avec Guy Laroche et J. Valtis, des urines d'un malade hématuriques. Les cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de l'une de ces souches et les lapins pré-munis par injection dans la veine ou sous la peau de la même dose de ces germes ont été surinfectés de un à trois mois après leur vaccination par inoculation sous-cutanée ou intraveineuse de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S très virulente. Un nombre égal d'animaux neufs témoins non vaccinés a reçu en même temps la même inoculation virulente.

Dans une autre série d'expériences, des cobayes vaccinés et des cobayes témoins ont été infectés par la voie buccale ou par la voie oculaire. A différents intervalles après leur surinfection, 1 vacciné et 1 témoin ont été sacrifiés en même temps. Des fragments de leurs principaux organes : rate, foie, poumons et reins étaient prélevés aseptiquement.

1 g de chacun d'eux était pesé au trébuchet, broyé dans un mortier avec du sable stérile, traité ensuite par la soude à 4 p. 100, puis par l'acide chlorhydrique à 4 p. 100. Le volume total était mesuré, puis complété à 10 cm<sup>3</sup> avec de l'eau physiologique. A 1 cm<sup>3</sup> de cette suspension, on ajoutait 4 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Cette dernière suspension contenait donc 1 cg de tissu d'organe par 0,5 cm<sup>3</sup> de liquide. L'ensemencement était pratiqué sur le milieu de Löwenstein-Jensen, réparti dans des





EXP. II. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de la souche avirulente Béc. Epreuve trente-quatre jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS	INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemcements des organes 15 jours					
	Vacciné			Témoin		
	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu
Rate . . . . .	0	12	300	0	100	2 500
Poumons . . . . .	0	0	0	0	1	25
Foie . . . . .	0	1	25	0	1	25
Reins . . . . .	0	0	0	0	0	0

EXP. III. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Epreuve quatre-vingt-dix jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 0,01 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANE PRÉLEVÉ	INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemcements des organes							
	4 jours		15 jours				30 jours	
	Vacciné		Témoin		Vacciné		Témoin	
	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes
Rate entière ensemcée sur 2 tubes de Legroux.	0	0	0	1	0	0	0	30
							6 tuberc. sur rate. Rien sur autres orga es.	100
							Nb. tuber. sur rate et autres organes.	250

Chez les cobayes vaccinés sous la peau par le BCG ou par un autre bacille avirulent (souche Béc.) et éprouvés par inoculation sous-cutanée d'un bacille virulent, les germes de surinfection, comme l'ont constaté avant nous d'autres auteurs, n'ont apparu en général dans les organes des cobayes vaccinés que quatre semaines après cette épreuve, alors qu'ils se sont manifestés beaucoup plus précocement dans ceux des témoins. Cependant,



EXP. IV. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Epreuve quarante jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 0,01 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANE PRÉLEVÉ	INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et lesensemencements des organes									
	10 jours				17 jours				27 jours	
	Vacciné		Témoin		Vacciné		Témoin		Vacciné	Témoin
	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes
Rate entière ensemencée sur 4 tubes de Legroux.	0	4 (BCG)	0	200	0	Contam. miné.	0	250	15 tuber. sur rate. Rien aux autres organes.	60  Nb. tuber. sur tous organes

nous avons pu en déceler, au bout de quinze jours après la surinfection, dans la rate d'un cobaye vacciné et en plus petit nombre dans son foie.

Les numérations des colonies développées sur le milieu de Löwenstein-Jensen nous ont montré qu'il y a environ dix fois moins de bacilles tuberculeux de surinfection dans les organes des animaux vaccinés que dans ceux des témoins. Chez les cobayes vaccinés comme chez les cobayes témoins, la rate est toujours plus riche en bacilles que les autres organes. Les ensemencements des reins sont toujours restés négatifs chez les vaccinés et chez les témoins.

B. — Vaccination par la voie sous-cutanée.  
Epreuve par la voie veineuse (voir Exp. V et VI).

Chez les cobayes vaccinés par le BCG ou par la souche Béc. par la voie sous-cutanée et éprouvés avec un bacille tuberculeux virulent par la voie veineuse, l'apparition dans les organes des bacilles de surinfection s'est produite en même temps chez les cobayes vaccinés et chez les cobayes témoins, vers la fin de la deuxième semaine après leur surinfection, en nombre à peu près équivalent dans les organes des premiers et des seconds, mais en plus grande quantité dans la rate.



Exp. V. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Epreuve quatre-vingt-dix jours plus tard par inoculation intraveineuse de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemencements des organes												
ORGANES PRÉLEVÉS		7 jours						14 jours				
		Vacciné			Témoin			Vacciné			Témoin	
		Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes
Rate . . . . .	Granuleuse.	2 (BCG)	»	Granuleuse.	0	»	Granuleuse.	22	550	Granuleuse.	17	425
Foie . . . . .	0	0	»	0	0	»	0	0	»	0	1	25
Poumons . . . .	0	0	»	2 tuberc.	1	25	0	3	75	0	2	50
Reins . . . . .	0	0	»	0	0	»	0	0	»	0	0	0

Exp. VI. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de la souche avirulente Béc. Epreuve trente-quatre jours plus tard par inoculation intraveineuse de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS	INTERVALLE ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemencements des organes 15 jours					
	Vacciné			Témoin		
	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu
Rate . . . . .	Début.	250	6 250	Début	250	6 250
Foie . . . . .	Début.	30	1 250	0	52	1 300
Poumons. . .	0	22	550	0	80	2 000
Reins. . . . .	0	0	0	0	0	0

C. — Vaccination par la voie sous-cutanée.  
Epreuve par la voie conjonctivale (voir Exp. VII).

Avec A. Calmette et A. Boquet, nous avons souvent utilisé la voie conjonctivale, suivant la technique de A. Calmette et Grysez, pour mettre en évidence la résistance à une surinfection virulente d'épreuve des cobayes vaccinés par le BCG. Les cobayes

ainsi infectés ont une tuberculose qui évolue beaucoup plus lentement que celle réalisée par inoculation sous-cutanée de bacilles virulents. Mais, pour avoir une infection régulière chez les animaux inoculés, il faut employer, comme nous l'avons vu avec Boquet, une suspension de bacilles virulents contenant 10 mg de ces germes par centimètre cube. En déposant 1 goutte de cette suspension sur chaque œil, on infecte le cobaye avec 1 mg de bacilles virulents.

Les cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de BCG et surinfectés massivement par instillation de 1 mg de bacilles tuberculeux virulents sur la conjonctive n'ont présenté, comme les cobayes témoins, aucun germe dans leurs organes dix et trente jours après l'infection. Ce n'est qu'au trente-quatrième et au quarante-deuxième jour que les bacilles de surinfection ont apparu dans la rate et dans le foie des témoins, alors que les ensemencements des organes des vaccinés sont restés négatifs.

EXP. VII. — *Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Epreuve quarante jours plus tard par instillation sur la conjonctive de chaque œil de 0,5 mg de bacilles de la souche bovine Dupray S.*

ORGANES PRELEVÉS	INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemencements des organes											
	34 jours						42 jours					
	Vacciné			Témoin			Vacciné			Témoin		
	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu
	Hypertrophie des ganglions sous-maxillaires et cervicaux.						Hypertrophie des ganglions sous-maxillaires et cervicaux.					
Rate . . . .	0	0	0	0	48	1 200	0	0	0	Quelques tuberc.	55	1 375
Foie . . . .	0	0	0	0	8	200	0	0	0	Quelques tuberc.	15	375
Poumons . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reins . . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D. — *Vaccination par la voie sous-cutanée.  
Epreuve par la voie buccale.*

Nous avons souvent constaté avec A. Boquet que pour infecter régulièrement des cobayes par la voie buccale, il faut leur faire

ingérer à trois reprises une dose importante de bacilles tuberculeux virulents. C'est dans ce but que, dans les expériences suivantes, nous avons employé pour la surinfection des cobayes vaccinés, dans la première expérience, 33 mg de germes, dans la seconde 30 mg.

EXP. VIII. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Epreuve quarante jours plus tard par ingestion à trois reprises et à deux jours d'intervalle de 1 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS	INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS DE BACILLES et lesensemencements des organes							
	24 jours				30 jours			
	Vaccinés		Témoins		Vaccinés		Témoins	
	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes
Rate . . . . .	0	2 (BCG)	0	0	0	0	0	0
Foie . . . . .	0	0	0	0	0	0	0	8
Poumons . . .	0	0	0	0	0	0	0	0

EXP. IX. — Vaccination par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG. Epreuve quatre-vingt-dix jours plus tard par ingestion à trois reprises et à deux jours d'intervalle de 10 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS	INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et lesensemencements des organes											
	10 jours						30 jours					
	Vaccinés			Témoins			Vaccinés			Témoins		
	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 2 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sus 2 tubes	Nb. col. par g de tissu
Rate . . . . .	0	0	0	0	0	0	1 tube.	45	2 250	Nb. tub	Incomptables.	
Foie . . . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Nb. tub.	Incomptables.	
Poumons . . . . .	0	0	0	0	0	0	Quelques granulations.	50	2 500	Nb. tub.	Incomptables.	

Le cobaye vacciné par la voie sous-cutanée et surinfecté par ingestion de 3 mg de bacilles tuberculeux virulents n'a eu, au



Exp. X. — Vaccination par injection intraveineuse de 10 mg de BCG.  
Epreuve trente jours plus tard par inoculation intraveineuse de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS		INTERVALLES ENTRE LES INOCULATIONS DES BACILLES DE SURINFECTION ET LES ENSEMENCEMENTS DES ORGANES											
		15 jours				30 jours				60 jours			
		Vacciné		Témoin		Vacciné (1)		Témoin		Vacciné		Témoin	
		Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes
Poumons . . . .	0	6	450	0	20	500	par g de tissu	Fines granulations.	42	300	Nb. tuberc.	100	2 500
Foie . . . . .	0	0	0	0	41	275	0	0	0	0	0	0	0
Rate . . . . .	0	0	0	0	12	300	0	0	0	0	0	0	0
Reins . . . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
								Quelques tuberc.	28	700	0	Quelques tuberc.	400
								Nb. tuberc.	28	700	0	Nb. tuberc.	2 500
								Quelques tuberc.	28	700	0	Nb. tuberc.	41
												Incomptables.	150
													6
													400
													275

(1) Chez un autre lapin vacciné et surinfecté de la même façon et sacrifié trente jours après la surinfection, nous avons obtenu des résultats semblables.

trentième jour après cette épreuve, aucun bacille dans les organes. Le témoin ayant subi la même infection n'a présenté que quelques bacilles dans son foie.

Ce n'est qu'après une épreuve effectuée avec une dose dix fois plus forte : 30 mg, que des bacilles virulents de la surinfection ont été trouvés, trente jours après cette dernière, dans la rate et dans les poumons du cobaye vacciné, mais en quantité beaucoup moins considérable que chez le témoin non vacciné.

# EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS.

## A. — Vaccination par le BCG (voir Exp. X et XI).

On voit que dans l'expérience X (épreuve par la voie veineuse), les bacilles virulents ont apparu le quinzième jour dans les poumons du lapin vacciné et surinfecté et dans ceux des témoins. Les autres organes du lapin vacciné étaient indemnes de bacilles virulents alors que chez le témoin, ils étaient nombreux dans les autres organes, sauf les reins. Au trentième jour après la surinfection, le nombre des bacilles virulents a doublé dans les poumons du lapin vacciné, tout en restant près de dix fois inférieur à celui observé dans les mêmes organes du témoin. Le foie, la rate et les reins du vacciné ne contiennent pas de bacilles alors que ces derniers sont nombreux dans tous les organes du témoin. Au soixantième jour après la surinfection, les bacilles virulents ont apparu dans les reins du lapin vacciné. Le foie et la rate sont demeurés indemnes. Ceux des poumons ont augmenté, mais leur ensemencement n'a donné que

Exp. XI. — Vaccination par injection intraveineuse de 10 mg de BCG. Epreuve quarante jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS	INTERVALLE ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemencements des organes 19 jours					
	Vacciné			Témoin		
	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Nb. col. par g de tissu
Poumons . . . . .	0	(3 BCG)		0	100	2 500
Foie . . . . .	0	0		0	22	550
Rate . . . . .	0	0		0	30	750
Reins . . . . .	0	0		0	0	0

50 colonies alors que celles-ci sont incomputables dans les tubes ensemencés avec les poumons du lapin témoin.

Dans l'expérience XI, où les ensemencements ont été faits le dix-neuvième jour après la surinfection par la voie sous-cutanée, il n'y avait à cette date aucun bacille virulent dans les organes du lapin vacciné, alors qu'ils étaient nombreux dans ceux du témoin.

Il en a été de même dans une expérience semblable où le vacciné et le témoin ont été sacrifiés quarante-cinq jours après l'épreuve virulente.

#### B. — Vaccination par la souche avirulente Béc.

EXP. XII. — Vaccination par injection sous-cutanée de 20 mg de la souche Béc. Surinfection trente-trois jours plus tard par inoculation intraveineuse de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

ORGANES PRÉLEVÉS	INTERVALLE ENTRE LES INOCULATIONS des bacilles de surinfection et les ensemencements des organes 13 jours			
	Témoin		Vacciné	
	Lésions	Nb. col. sur 4 tubes	Lésions	Nb. col sur 4 tubes
Poumons . . . . .	0	0	0	100
Foie . . . . .	0	0	0	22
Rate . . . . .	0	0	0	30
Reins . . . . .	0	0	0	0

Un seul essai d'ensemencement des organes d'un lapin vacciné par la voie sous-cutanée et surinfecté par la voie veineuse montre, qu'au treizième jour après la surinfection, il n'y a pas de bacilles virulents dans les organes de cet animal alors qu'ils sont nombreux dans ceux du lapin témoin.

EXP. XIII. — Vaccination par injection sous-cutanée de 20 mg de la souche Béc. Surinfection trente-trois jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 0,002 mg de la souche bovine Dupray S.

Intervalle entre les inoculations des bacilles de surinfection et les ensemencements des organes : dix-neuf jours.

Le témoin de cette expérience est le même que celui de l'expérience XI. Ce dernier, au bout du même délai (dix-neuf jours), avait de nombreux bacilles dans ses organes, sauf dans les reins.



Chez le lapin de cette expérience, vacciné par la voie sous-cutanée, puis surinfecté par la même voie, il n'y avait, au dix-neuvième jour après la surinfection, aucun bacille virulent dans les divers organes.

Le quatre-vingt-dixième jour après la surinfection, il y avait chez un autre lapin vacciné, puis surinfecté, 75 colonies sur les deux tubesensemencés avec les poumons.

#### DISCUSSION.

Nos expériences sur des cobayes vaccinés par le BCG confirment les faits établis par A. Krause et M. Willis, puis par A. Boquet et ses collaborateurs sur le blocage des bacilles de surinfection pendant les quatre semaines qui suivent l'inoculation virulente. Mais la recherche de ces germes dans les organes par leur ensemencement sur le milieu de Löwenstein-Jensen, qui nous a permis de dénombrer les bacilles virulents, a mis en évidence chez les animaux vaccinés, puis surinfectés par la voie sous-cutanée, la prédominance des germes de surinfection dans la rate.

Ils y apparaissent en général plus tôt que dans les autres organes et y sont en tout cas toujours plus nombreux que dans le foie et dans les poumons. Comme cela a été maintes fois constaté, les reins des cobayes vaccinés et surinfectés comme ceux des témoins restent toujours indemnes de bacilles et de lésions.

Nos expériences ont en outre prouvé que, dans les organes des cobayes vaccinés par la voie sous-cutanée et surinfectés par la même voie, les bacilles de surinfection sont, dans les premières semaines après cette dernière, environ dix fois moins nombreux que dans ceux des témoins.

Chez les cobayes vaccinés par injection sous-cutanée de BCG ou de bacilles de la souche Béc. et surinfectés par la voie veineuse, les bacilles de surinfection ont apparu dans tous les organes sauf dans les reins en même temps que chez les témoins, vers le quinzième jour après la surinfection. Ils étaient en quantité à peu près égale chez les vaccinés et chez les témoins, mais toujours plus nombreux dans la rate. A. Boquet avait déjà montré qu'une surinfection endogène de cobayes vaccinés par le BCG ou par un bacille peu virulent n'est pas retardée, tandis que ces animaux présentent une résistance à une surinfection exogène.

Les résultats que nous avons obtenus chez les cobayes ont été différents lorsqu'il s'est agi d'une surinfection par les voies naturelles, conjonctivale et buccale.

Malgré une surinfection par une dose importante de 1 mg de bacilles tuberculeux virulents déposés sur les deux yeux, les germes de surinfection n'ont pu, quarante-trois jours après cette

dernière, être décelés dans les organes des cobayes vaccinés par la voie sous-cutanée, alors que la rate et le foie des animaux témoins en contenaient une grande quantité.

Il en a été de même chez les cobayes vaccinés au BCG par la voie sous-cutanée et surinfectés par la voie buccale avec 3 mg de bacilles virulents. Alors qu'au trentième jour après l'épreuve les bacilles virulents commençaient à apparaître dans les organes des témoins, ils étaient encore absents dans ceux des vaccinés.

Par contre, après une surinfection massive effectuée avec 30 mg de bacilles virulents, ces germes ont pu être décelés trente jours après la surinfection dans la rate et dans les poumons des cobayes vaccinés, mais en nombre beaucoup plus faible que chez les témoins pour lesquels l'envahissement de tous les organes par les bacilles virulents était si considérable que la numération des colonies sur les tubes ensemencés a été impossible. Les bacilles virulents de surinfection étaient un peu plus nombreux dans les poumons que dans la rate.

Contrairement à ce qui s'est passé chez les cobayes qui, malgré leur vaccination, n'ont présenté aucune résistance à une surinfection virulente réalisée par la voie veineuse, nous avons constaté chez les lapins vaccinés par injection intraveineuse de BCG, puis surinfectés par la même voie, une différence très nette entre les prémunis et les témoins au point de vue de la dissémination des bacilles virulents dans leurs organes.

A partir du quinzième jour après l'épreuve virulente, des bacilles virulents étaient présents dans les poumons, le foie et la rate des lapins témoins. Ils n'ont pas cessé d'augmenter en nombre, les poumons restant toujours plus riches en bacilles que les autres organes. Ils n'ont apparu dans les reins que le trentième jour. Au soixantième jour, ils étaient incomptables dans les poumons.

Par contre, chez les lapins vaccinés, nous avons constaté un retard beaucoup plus considérable dans la dissémination des bacilles de surinfection. Si ces derniers ont pu, dans certains cas, apparaître en petit nombre dès le quinzième jour après l'épreuve virulente dans les poumons du lapin vacciné et sont devenus deux fois plus nombreux le trentième jour, aucun bacille n'a pu être décelé à cette date dans les autres organes de cet animal. Ce n'est qu'après un délai de soixante jours après la surinfection que des bacilles virulents ont apparu dans les reins d'un lapin vacciné, le foie et la rate restant encore dépourvus de bacilles.

Chez les lapins vaccinés par injection sous-cutanée de 10 mg de BCG ou de la souche Béc. et surinfectés par la même voie, la dissémination des bacilles de surinfection a été beaucoup plus lente que chez ceux surinfectés par la voie veineuse : nous avons

constaté une absence complète de bacilles virulents dans leurs organes jusqu'au quatre-vingt-dixième jour après la surinfection, alors qu'ils ont apparu dès le dix-neuvième jour dans les organes des lapins témoins. Au quatre-vingt-dixième jour, les bacilles de surinfection se sont manifestés dans les poumons des lapins vaccinés, ce qui montre qu'après la surinfection sous-cutanée comme après la surinfection intraveineuse, les bacilles virulents apparaissent en premier lieu dans les poumons.

Pour Max Lurie, la résistance à une surinfection virulente des lapins préalablement vaccinés par des bacilles tuberculeux peu virulents est due à la lyse des germes de la surinfection. Si cette lyse existe, ne peut-on pas, d'après nos expériences, supposer qu'il y a aussi un tropisme particulier des bacilles de surinfection pour certains organes qui contribuerait à une répartition inégale de ces germes entre ces derniers ?

Nous avons vu en effet, chez le cobaye vacciné, surinfecté par inoculation sous-cutanée de bacilles virulents, un tropisme des bacilles de surinfection pour la rate et, de même chez le lapin vacciné puis surinfecté par inoculation intraveineuse ou sous-cutanée de bacilles virulents un tropisme des bacilles de surinfection pour les poumons, exactement comme ce qui se passe chez les cobayes et les lapins primo-infectés par les mêmes voies avec des bacilles tuberculeux virulents.

Quand on voit les analogies qui existent entre la tuberculose du lapin et celle de l'homme on peut se demander si la sensibilité des poumons de l'homme à l'infection tuberculeuse n'est pas due en grande partie au même tropisme des bacilles de Koch pour cet organe plutôt qu'à une infection d'origine aérogène à laquelle de si nombreux cliniciens attachent tant d'importance.

#### CONCLUSIONS.

Par l'ensemencement sur le milieu de Löwenstein-Jensen 1° des organes de cobayes et de lapins vaccinés par le BCG ou par une autre souche avirulente et surinfectés plus tard par des bacilles virulents, et 2° des organes d'animaux neufs témoins éprouvés de la même façon, nous avons pu en les sacrifiant dans les premières semaines après l'épreuve virulente établir les faits suivants :

Les bacilles tuberculeux de surinfection inoculés par la voie veineuse à des cobayes vaccinés sous la peau par le BCG ou par une autre souche avirulente apparaissent en même temps, vers le quinzième jour après cette épreuve, en quantités à peu près équivalentes dans les organes des vaccinés et des témoins non vaccinés. Les cobayes vaccinés ne présentent donc pas de résistance à une surinfection virulente réalisée par la voie veineuse.



Par contre, comme l'ont montré Krause et Willis, chez des cobayes vaccinés par la voie sous-cutanée puis surinfectés par la même voie, les bacilles virulents de surinfection n'apparaissent dans les organes que vers la fin de la quatrième semaine après l'épreuve virulente. Cependant, on peut les trouver dans la rate un peu plus précocement que dans les autres organes.

Lorsque des cobayes vaccinés par la voie sous-cutanée sont éprouvés avec des bacilles virulents par la voie oculaire ou par la voie buccale, l'apparition dans leurs organes des germes de surinfection se produit plus tardivement que dans le cas où ils sont éprouvés par la voie sous-cutanée. Il semble donc que les cobayes vaccinés résistent mieux aux infections par les voies naturelles, même réalisées avec une quantité importante de bacilles virulents qu'à une infection artificielle effectuée par la voie sous-cutanée avec une dose faible de ces germes.

Chez des lapins vaccinés par la voie veineuse, puis inoculés par la même voie avec des bacilles virulents, les germes de surinfection peuvent apparaître en petit nombre dans les poumons dès le quinzième jour après cette épreuve et ensuite dans les reins alors que la rate et le foie sont encore indemnes de bacilles. Chez les lapins témoins, les bacilles virulents sont présents dans les poumons, le foie et la rate dès le quinzième jour après l'épreuve et ensuite dans les reins.

Contrairement à ce qui se passe chez les cobayes vaccinés surinfectés par la voie veineuse, les lapins vaccinés présentent donc une résistance à une surinfection virulente par cette voie.

Après une surinfection par la voie sous-cutanée des lapins vaccinés, les bacilles de surinfection se sont manifestés également en premier lieu dans les poumons avec un retard beaucoup plus grand, vers le quatre-vingt-dixième jour après l'épreuve, que chez les lapins surinfectés par la voie veineuse.

Nos expériences ont d'autre part démontré par le dénombrement des colonies développées sur les milieuxensemencés que, dans les premières semaines après la surinfection, les bacilles de l'épreuve virulente, à partir du moment où ils apparaissent dans les organes des animaux vaccinés, sont toujours au moins dix fois moins nombreux chez ces derniers que chez les témoins.

Les bacilles de surinfection sont toujours plus nombreux que dans les autres organes : dans la rate, chez les cobayes, et dans les poumons chez les lapins.

Les deux facteurs principaux qui paraissent intervenir dans l'établissement de la résistance antituberculeuse sont donc le retard dans la dissémination des germes de surinfection dans les organes et, en conséquence, la raréfaction dans ces derniers des germes par rapport aux témoins non vaccinés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] RIST, KINDBERG et ROLLAND. *Ann. Méd.*, 1914, **1**, 310 et 375. — ROLLAND. *Thèse Faculté de Médecine de Paris*, 1914.
- [2] A. K. KRAUSE et M. WILLIS. *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1920, **4**, 135 ; 1925, **1**, 439 ; 1926, **14**, 211. — A. K. KRAUSE. *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1926, **14**, 271. — A. K. KRAUSE et D. PETERS. *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1920, **4**, 551. — M. S. WILLIS. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1925, **11**, 427-439.
- [3] A. BOQUET. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 1029 ; 1931, **108**, 632 ; 1932, **109**, 363 et 1166 ; 1932, **110**, 769. — A. BOQUET et L. NÈGRE. *Ces Annales*, 1929, **40**, 11. — A. BOQUET et J. VALTIS. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 373. — A. BOQUET, J. VALTIS et A. SAENZ. *Ces Annales*, 1931, **46**, 373. — A. BOQUET. *Ces Annales*, 1933, **50**, 5.
- [4] M. LURIE. *J. exp. Med.*, 1928, **48**, 155 ; 1929, **50**, 747.

## MISE AU POINT D'UNE RÉACTION D'HEMAGGLUTINATION PROTÉINIQUE POUR LA PESTE

par R. NÉEL et M. BALTAZARD (\*).

(*Institut d'Etat des Sérums et Vaccins d'Hessarek [Institut Razi]  
et Institut Pasteur de l'Iran.*)

La multiplicité des réactions sérologiques dans la peste et le nombre considérable des travaux qui leur ont été consacrés [1, 2] montrent qu'aucune d'elles n'est pleinement satisfaisante et que leur valeur pratique est limitée, en dehors des applications expérimentales.

L'agglutination, malgré les difficultés auxquelles on se heurte dans la préparation de suspensions homogènes et stables, reste toujours la réaction de base. La fixation du complément, depuis l'emploi de la fraction IA [3] comme antigène par Chen, Quan et Meyer [4], est devenue la méthode de choix, mais sa sensibilité n'est pas supérieure à celle des autres tests, en particulier de l'agglutination.

Récemment Amies [5], puis Chen [6], ont montré que l'hémagglutination de Keogh, North et Warburton [7] était applicable à la peste. Mais nous estimons, à la suite de recherches sur la valeur pratique comparée de quelques réactions sérologiques (travail en cours de rédaction), que cette méthode n'est pas encore entrée dans le domaine pratique et que, pour de nombreuses raisons, elle est très inférieure aux deux techniques précitées. D'ailleurs, de par son principe même (adsorption de substances antigéniques de nature polyosidique), il semble logique qu'il en soit ainsi, étant donné ce que nous savons de la nature de l'antigène pesteux.

Tous les travaux modernes ont en effet montré que les fractions purifiées, antigéniques et immunisantes de *Pasteurella pestis* sont des protéines, parfois associées à une faible proportion de polysaccharides, selon le procédé adopté pour l'extraction et la purification [3, 5, 8].

Cherchant à mettre au point, pour la détection des anticorps

(\*) Manuscrit reçu le 9 septembre 1953.



chez les rongeurs résistants à la peste, une réaction de haute sensibilité, nous avons pensé utiliser la modification apportée par Boyden [9] à la réaction d'hémagglutination de Keogh. On sait que cet auteur, grâce au tannage préalable des hématies, parvient à fixer sur celles-ci des antigènes de nature protéinique et les rend ainsi agglutinables par les antisérums correspondants. Pour l'antigène tuberculeux, Boyden [9] (puis Grabar, Boyden et coll. [10]) a mis ainsi en évidence une réaction d'hémagglutination protéinique plus sensible, mais d'interprétation plus délicate que la classique réaction de Middlebrook et Dubos [41].

Nous disposions d'autre part d'un antigène pesteux purifié, la fraction IA [3], dont le professeur K. F. Meyer avait bien voulu, lors de sa venue à Téhéran, nous remettre un lot important. Cet antigène avait de plus l'avantage d'être totalement inactif dans l'hémagglutination polysidique, comme Chen [6] l'a signalé et comme nous l'avons nous-mêmes constaté.

#### A. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

La technique de la réaction est dans ses grandes lignes celle de Boyden [9]. Une seule modification importante y a été apportée, le remplacement de la sédimentation spontanée des hématies à la température du laboratoire ou à  $+4^{\circ}$  par une centrifugation modérée et courte.

1° MATÉRIEL ET RÉACTIFS. — 1° *Verrerie*. — N'utiliser que des tubes à hémolyse de 10 à 11 mm de diamètre intérieur, à fond régulièrement hémisphérique, tout tube présentant des irrégularités dans la fabrication devant être rejeté. Cette double condition est nécessaire pour obtenir une bonne sédimentation et une réémulsion facile du culot.

Ces tubes, en verre neutre, devront être très propres; après immersion dans le mélange sulfo-chromique de Küss, ils seront très soigneusement lavés à l'eau courante puis bidistillée pour éliminer toute trace d'acide. L'inobservation de ces précautions peut influencer considérablement sur la sensibilité de la réaction.

2° *Eau distillée*. — Ne se servir dans la préparation des réactifs et de l'eau physiologique que d'eau bidistillée afin d'éliminer les traces de cuivre qui pourraient fausser la réaction [42].

3° *Produits chimiques*. — Purs.

4° *Eau physiologique*. — A 9 p. 1 000 de chlorure de sodium.

5° *Hématies de mouton*. — Prélèvement aseptique et conservation à  $+4^{\circ}$  en solution d'Alsever modifiée [43], à raison de 100 ml de sang pour 120 ml de liquide conservateur. Utiliser après trois jours et jusqu'à deux semaines.

## Solution d'Alsever :

Glucose . . . . .	2,05 g
Citrate trisodique . . . . .	0,80 g
Chlorure de sodium . . . . .	0,42 g
Eau distillée . . . . .	100 ml

Ajuster à pH 6,1 avec une solution d'acide citrique à 10 p. 100.  
Stériliser à 115° pendant vingt minutes ou par filtration.

## 6° Solutions salées tamponnées.

N° 1. Eau physiologique . . . . .	40 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{KH}_2$ à 0,15 M . . . . .	28 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ à 0,15 M . . . . .	Q. S. P. pH 6,4
N° 2. Eau physiologique . . . . .	40 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{KH}_2$ à 0,15 M . . . . .	12 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ à 0,15 M . . . . .	Q. S. P. pH 7,2

7° *Solution d'acide tannique*. — « Acidum tannicum pur. lev. — Görlitz — Deutschland ». Solution en eau physiologique à 1 p. 15 000, à préparer extemporanément, les solutions diluées ne se conservant pas.

8° *Antigène*. — « Fraction IA — Lot 278-53-8 — Hooper Foundation, University of California — 10 novembre 1952 ». Solution en eau salée tamponnée à pH 6,4 titrant 0,750 mg/ml ou 1 mg/ml. Dissoudre soigneusement. Centrifuger et décanter pour avoir un liquide antigénique clair, à peine opalescent. Ne pas utiliser de tubes en matière plastique pour la centrifugation.

9° *Sérum de lapin normal*. — Après inactivation, faire une solution au 1/250 en eau physiologique.

10° *Immunsérums*. — Inactivation une demi-heure à 56°.

2° *TECHNIQUE DE LA RÉACTION*. — 1° *Lavage des hématies*. — Après séparation du liquide conservateur, laver trois fois à l'eau physiologique. Centrifuger à 2 000 t/m pendant dix minutes. Remettre les hématies en suspension en solution salée tamponnée à pH 7,2 au taux de 2,5 p. 100.

2° *Tannage des hématies*. — Mélanger un volume de suspension globulaire et un volume de solution tannique fraîche. Agiter et laisser en contact pendant dix minutes à la température du laboratoire. Laver une fois dans la solution salée tamponnée à pH 7,2. Centrifuger à 1 500 t/m pendant trois minutes. Remettre en suspension en eau physiologique sous le volume initial.

3° *Sensibilisation des hématies tannées*. — A un volume de la suspension d'hématies tannées, ajouter 4 volumes de la solution de fraction IA. Laisser en contact quinze minutes à la température du laboratoire. Laver une fois dans le sérum de lapin dilué au 1/250. Centrifuger à 1 500 t/m pendant trois minutes. Remettre en suspension dans ce même sérum sous le volume initial. On a ainsi une suspension globulaire à 2,5 p. 100.

FIG. 4. — Hémagglutination par centrifugation.

Aspect de la réaction après lecture immédiate par agitation, puis sédimentation secondaire à  $+4^{\circ}$ . Sérum L 4.



$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1\ 600}$	$\frac{1}{3\ 200}$	$\frac{1}{6\ 400}$	$\frac{1}{12\ 800}$	$\frac{1}{25\ 600}$	Témoin sérum normal.
+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	
Zone de réaction positive avec agglutinats.									
+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	
Zone de réaction négative.									
+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	

FIG. 2. — Hémagglutination par sédimentation primitive.

Même sérum que figure I.

Aspect de la réaction après sédimentation primitive à la température du laboratoire pendant une nuit. Sérum L4.



$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	Témoin eau sérum normal.	Témoin physiol.
Zone de réaction positive du type agglutinat.										
Présence d'agglutinats après agitation :										
++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0



N.-B. — Signalons que la température ambiante, au cours de tous nos essais, oscillait entre 28° et 32°.

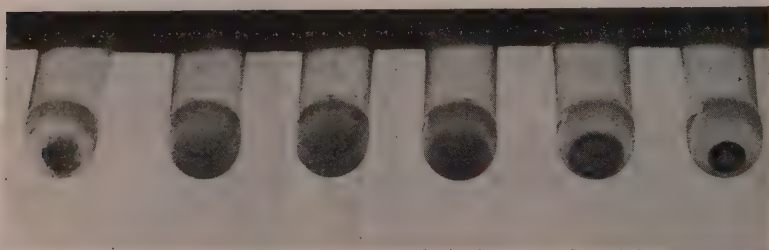
Il faudrait recommencer les opérations précédentes si au cours des manipulations on observait une hémolyse même légère. Cette éventualité ne s'est cependant jamais présentée au cours de nos nombreux essais.

La suspension globulaire sensibilisée ne se conserve que peu de temps et après vingt-quatre heures à + 4° on note fréquemment un très léger degré d'hémolyse.

4° *Exécution de la réaction.* — Répartir dans les tubes à hémolyse les dilutions croissantes de sérum à tester, sous un volume

FIG. 3. — *Hémagglutination par centrifugation.*

Aspect de la réaction après lecture immédiate par agitation et sédimentation secondaire pendant une nuit à la température de laboratoire. Sérum L 2.



$\frac{1}{200}$

$\frac{1}{400}$

$\frac{1}{800}$

$\frac{1}{1\ 600}$

$\frac{1}{3\ 200}$

$\frac{1}{6\ 400}$

Réaction positive.  
Virus.

Réaction  
douteuse.

Réaction négative.

Type : Aggl.

Présence d'agglutinats à la lecture directe par agitation :

+++

++

+

0

0

0

de 0,5 cm<sup>3</sup>. Ajouter la suspension globulaire sensibilisée à raison de 0,05 cm<sup>3</sup> (1 goutte) par tube.

Témoin eau physiologique + hématies tannées sensibilisées.

Témoin sérum normal + hématies tannées sensibilisées.

Placer au bain-marie à 37° pendant dix minutes.

Centrifuger à 1 000 t/m pendant cinq minutes (centrifugeuse de rayon 12 cm). Rappelons que la force centrifuge est directement proportionnelle au diamètre et au carré de la vitesse.

5° *Lecture.* — Déjà au sortir du bain-marie, dans les tubes fortement positifs, l'agglutination des hématies est visible à l'œil nu.

*Première lecture :* Réémulsionner le culot par quelques secousses légères sur le fond du tube.

Dans les tubes fortement positifs (+++), le culot se dissocie

immédiatement et très facilement en gros agglutinats qui tranchent sur le fond clair du liquide.

Dans les tubes négatifs et témoins (0), la réémulsion du culot est plus difficile et les hématies se remettent en suspension de façon homogène.

Dans les tubes présentant des degrés intermédiaires de positivité (+++ à +), la grosseur des agglutinats va en diminuant et en même temps le liquide de suspension devient de plus en plus trouble.

Les agglutinats résistent parfaitement à une agitation forte. La lecture se fait à l'œil nu et on peut contrôler les tubes faiblement positifs en employant la loupe  $\times 5$ .

*Deuxième lecture :* Placer les tubes sur un portoir et laisser sédimenter spontanément à  $+4^{\circ}$  pendant trois à quatre heures ou une nuit. Lire alors la réaction par appréciation de la forme du culot, soit directement à l'œil nu, soit au miroir concave.

Dans les tubes positifs ++++ et +++, les agglutinats sont ramassés au centre du tube.

Dans les tubes positifs ++ et +, on a un aspect du type virus mince couche globulaire avec présence de fins agglutinats.

Dans les tubes négatifs et témoins, la sédimentation se fait en forme d'anneau et en pastille.

Cette deuxième lecture contrôle la première ; elle est nécessaire pour confirmer la positivité du type +.

N. B. — Les figures 1 et 3 illustrent parfaitement l'exposé précédent.

## B. — RÉSULTATS.

Dans une première série d'essais, nous avons testé par les deux réactions d'hémagglutination protéinique et d'agglutination (nous en donnerons la technique dans un prochain travail) :

1° Des sérums de lapins faiblement immunisés ;

2° Des sérums de mérions ayant résisté à la contamination expérimentale.

Les résultats sont condensés dans le tableau I.

On voit que les titres obtenus par hémagglutination sont en moyenne cinq fois supérieurs à ceux décelés par l'agglutination ; de plus un des sérums est seulement positif à l'hémagglutination.

Parallèlement, 122 sérums normaux d'homme, de lapin, de cobaye et de mérion ont toujours fourni des résultats négatifs à des dilutions allant de  $1/2$  à  $1/5$ .

D'autre part, dans une deuxième série d'essais, nous avons recherché l'évolution de la réaction d'hémagglutination protéinique chez deux lapins qui ont reçu, par voie intraveineuse, une

TABLEAU I — Valeur comparée des réactions d'hémagglutination protéinique et d'agglutination Lecture directe par agitation après centrifugation.

SÉRUM	Hémagglutination protéinique										Agglutination							
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	25	50	100	200	300	400	800	1600	3200	10	20	50	100	200	300	400		
L 1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	++	+++	+++	+++	++	+		
L 2	+++	+++	+++	++	+++	++	+			++	+++	+++	+++	++	+			
M 1	+++	++	++							++	+							
M 2	+++	+++	++	+						++	+	+						
M 3	+++	++																

TABLEAU II. — Evolution de la réaction chez le lapin à la suite d'une seule injection intraveineuse de *P. pestis*.

Ce tableau montre à la fois la précocité et la sensibilité de la réaction alors que la dose injectée était faible.

SÉRUM	I 2	I 4	I 8	I 16	I 50	I 100	I 200	I 400	I 800	I 1600	I 3200
Lapin 1											
1 <sup>o</sup> jour											
5 <sup>o</sup> jour	+++	++	+								
8 <sup>o</sup> jour	nf	nf	+++	+++	+++	++	+				
12 <sup>o</sup> jour	nf	nf	nf	nf	+++	++++	++++	+++	++	+	
Lapin 2											
1 <sup>o</sup> jour											
5 <sup>o</sup> jour	+++	++	+								
8 <sup>o</sup> jour	nf	nf	++	+++	+++	+++	++	+			
12 <sup>o</sup> jour	nf	nf	nf	nf	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

nf : non fait .

seule dose de 0,25 cm<sup>3</sup> d'une émulsion de 1 000 000 000 de germes de bacilles pesteux souche EV, cultivés à 37°. Le tableau II résume nos observations.

### C. — DISCUSSION.

Les considérations suivantes nous ont guidés dans la mise au point de la réaction.

1<sup>o</sup> *Titre de la solution tannique.* — Etant donné les différences dans la préparation et la purification des acides tanniques de marque différente, il est nécessaire de rechercher la concentration optima de l'acide tannique choisi. Avec l'acide tannique purifié que nous avons employé (Acidum tannicum pur. lev.-Görlitz-Deutschland), le taux de 1 p. 15 000 nous a donné les résultats les meilleurs, c'est celui que nous avons adopté.

2<sup>o</sup> *Titre de la solution sensibilisante.* — Les taux de 1 mg/ml



à 0,750 mg/ml de fraction IA donnent des résultats du même ordre de grandeur. A des concentrations moins fortes, la zone de positivité baisse sensiblement, cependant on a encore une hémagglutination appréciable avec 5 µg/ml d'antigène.

Le tableau III résume nos expériences.

TABLEAU III. — Influence du titre de la solution sensibilisante.

mg/ml de fraction IA	I 100	I 200	I 400	I 800	I 1600	I 3200
I mg/ml	++++	++++	++++	+++	++	+
750mg/ml	++++	++++	++++	+++	++	+
350mg/ml	++++	++++	+++	++	+	
50mg/ml	+++	+++	++			
5mg/ml	+++	++				

Des doses très faibles de fraction IA provoquent donc encore la formation d'agglutinats. La formation d'agglutinats, observée exceptionnellement par Boyden [9] et jamais par Borduas et Grabar [14] est probablement due d'une part à la spécificité et à la pureté de l'antigène utilisé, puisque nous les observons avec la technique par sédimentation primitive employée par ces auteurs, d'autre part au facteur centrifugation comme nous le verrons plus loin (voir fig. 1 et 2).

Quel que soit le mécanisme de la sensibilisation (formation probable d'un complexe acide tannique-protéine), on a intérêt à ce que les opérations de tannage et de sensibilisation soient soigneusement exécutées, afin d'éviter des réactions non spécifiques, étant donné le comportement particulier des hématies tannées et sensibilisées, très différent de celui des hématies normales.

3° Influence du tannage et de la sensibilisation sur le comportement des hématies. — Le tannage exerce une action inhibitrice sur l'hémolyse et l'agglutination naturelle des hématies, action qui est encore renforcée par la sensibilisation.

1° Hémolyse. — Le tableau IV montre l'action qu'exercent le

TABLEAU IV. — Influence du tannage et de la sensibilisation sur l'hémolyse.

Dilution du sérum	I 2	I 4	I 8	I 16	I 32
H. normales	++++	++++	+++	++	
H. tannées	++	++	+		
H. sensibil	+				

tannage et la sensibilisation sur l'hémolyse des hématies de mouton par un sérum neuf et non inactivé de lapin.

Des résultats analogues ont été obtenus avec des sérums d'homme ou de cobaye. L'inactivation des sérums peut donc être supprimée dans certains cas, quand on opère avec des sérums dilués.

2° *Agglutination*. — L'effet inhibiteur s'exerce aussi sur l'agglutination naturelle des hématies par les sérums non saturés, comme le montre le tableau V.

TABLEAU V. — Influence du tannage et de la sensibilisation sur l'agglutination naturelle.

Dilution du sérum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$
H. normales	++++	+++	++	+	
H. tannées					
H. sensibil					

Signalons que les hématies tannées peuvent quelquefois présenter encore un certain degré d'agglutinabilité qui se traduit, avec des sérums positifs ou négatifs, au cours de la centrifugation par la présence de fins agglutinats ou au cours de la sédimentation lente primitive par une agglutination du type virus, aspect que l'on retrouve si l'on remplace les sérums par de l'eau physiologique.

Les hématies tannées et sensibilisées, en présence de sérum négatif non saturé (ou en eau physiologique) se comportent toujours comme les hématies normales dans ce même sérum saturé.

La saturation des sérums n'est donc pas nécessaire, ce qui évite une opération supplémentaire, au cours de laquelle la perte de sérum peut être appréciable, surtout quand on opère sur de très petites quantités, comme c'est le cas pour le mériion.

3° *Influence de la centrifugation*. — La mise au bain-marie préalable (dix minutes à 37°) nous a paru rendre la réaction plus sensible ; déjà, au sortir du bain-marie, on observe une légère agglutination visible à l'œil nu dans les tubes fortement positifs.

Nous avons utilisé la centrifugation dans l'hémagglutination polysidique pesteuse sans aucun avantage appréciable, sinon celui de la rapidité. Entre temps, Suchet [15] a appliqué cette méthode à la réaction de Middlebrook et Dubos et n'a obtenu que des résultats superposables à ceux de la méthode lente.

Par contre, la centrifugation dans l'hémagglutination protéinique pesteuse a une action renforçatrice considérable qui se traduit, par rapport à la réaction par sédimentation lente, par :

1° La formation d'agglutinats dans un plus grand nombre de tubes, le tableau VI en donnant un exemple :

TABLEAU VI. — Comparaison entre la centrifugation et la sédimentation lente. Action de la centrifugation sur la formation des agglutinats.

SÉRUM L I (Planches I, 2)	$\frac{I}{100}$	$\frac{I}{200}$	$\frac{I}{400}$	$\frac{I}{800}$	$\frac{I}{1600}$	$\frac{I}{3200}$
Centrifugation	++++	++++	++++	+++	++	+
Sédimentation	+++	+++	++	+		

2° Corrélativement l'observation d'agglutinats (même avec un sérum faiblement positif) dans une zone où par sédimentation primitive on ne note qu'une agglutination du type virus.

3° Le renforcement considérable de la cohésion des hématies, une agitation sévère ne dissociant pas les agglutinats formés au cours de la centrifugation, alors que ceux obtenus par sédimentation primitive le sont aisément.

La lecture de la réaction se trouve ainsi facilitée. Elle se fait, comme nous l'avons vu plus haut par :

1° Une première lecture par agitation immédiate au sortir de la centrifugeuse ;

2° Une deuxième lecture, après sédimentation secondaire, qui sert surtout de vérification pour les tubes faiblement positifs.

La lecture, par examen du culot après centrifugation (centrifugeuse horizontale) ne donne qu'une idée approximative de la positivité ; nous ne l'avons pas retenue.

Les figures 1, 2, 3 illustrent parfaitement toutes les considérations précédentes.

#### D. — RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

L'hémagglutination protéinique, appliquée à la peste, donne une réaction bien supérieure aux autres réactions sérologiques et en particulier à la réaction d'agglutination.

Elle se caractérise par :

1° Une *exécution facile*, non seulement parce que les incidents techniques au cours de la préparation des hématies semblent exceptionnels, mais encore parce que le tannage et la sensibilisation des hématies exercent une action inhibitrice remarquable sur l'hémolyse et l'agglutination naturelle des hématies de mouton par les sérums, ce qui permet, tout au moins, de supprimer la saturation des sérums à tester.

2° Une *grande sensibilité* qui paraît due à deux causes :

a) L'emploi d'un *antigène très purifié*, fraction IA, ne contenant des polysaccharides qu'en faible proportion. On élimine de



ce fait la fixation possible d'autres substances protéiniques non spécifiques, la réaction ne faisant plus appel qu'à l'antigène d'enveloppe immunisant et spécifique. La partie glucidique, dont le rôle dans l'immunisation antipesteuse est discutée, n'intervient pas, tout au moins directement, non seulement du fait de la fixation immédiate préalable, mais aussi du fait que la fraction IA ne sensibilise pas les hématies dans la méthode polysidique classique. En pratique, l'utilisation d'un antigène pur se traduit déjà par la formation d'agglutinats dans la zone de forte positivité (++++) et (+++).

b) *L'emploi de la centrifugation*, qui renforce encore la réaction et permet l'obtention d'agglutinats dans toute la zone de positivité (++++ à +), à la place d'une agglutination du type virus.

Par voie de conséquence, cette réaction permet :

1° La détection précoce de taux faibles d'anticorps (vraisemblablement précipitines) alors que la réaction d'agglutination est encore négative ;

2° L'obtention de taux de positivité en moyenne cinq fois supérieurs à ceux fournis par l'agglutination.

Il serait intéressant de pouvoir étudier le comportement des autres fractions antigéniques isolées à partir du bacille pesteux : fraction IB, antigène d'Amies, antigène A de Seal et leur sensibilité dans ce type de réaction.

La réaction d'héماغglutination protéinique semble applicable à tous les tests de laboratoire et, étant donné sa précocité et sa sensibilité, également aux tests de clinique, d'épidémiologie et d'épizootologie.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] WU LIEN-TEH, J. CHUN, R. POLLITZER et C. YU. *Plague. A Manual for medical and public Health Workers*. Shanghai, 1936.
- [2] R. POLLITZER. *Bull. O. M. S.*, 1952, **16**, 40.
- [3] E. BAKER, H. SOMMER, L. FOSTER, E. MEYER et K. F. MEYER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **64**, 139.
- [4] T. CHEN, S. QUAN et K. F. MEYER. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 147.
- [5] C. AMIES. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 259.
- [6] T. CHEN. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 587.
- [7] E. KEOGH, E. NORTH et M. WARBURTON. *Nature*, 1947, **160**, 63.
- [8] S. SEAL. *J. Immunol.*, 1951, **67**, 93 ; *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **77**, 675.
- [9] S. BOYDEN. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [10] P. GRABAR, S. BOYDEN, A. TAQUET et A. BORDUAS. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 899.
- [11] G. MIDDLEBROOK et R. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [12] V. SAUTTER et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1948, **74**, 261.
- [13] S. BUKANTZ, C. REIN et J. KENT. *J. Lab. Clin. Med.*, 1946, **31**, 394.
- [14] A. BORDUAS et P. GRABAR. *Ces Annales*, 1953, **84**, 903.
- [15] A. SUCHET. *Ann. Biol. Clin.*, 1952, **40**, 412.

## **SUR LA TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE DE LA BRUCELLOSE AU RAT BLANC**

par H. JACOTOT et A. VALLÉE.

[Aide-technique A. LE PRIOL] (\*).

*(Institut Pasteur. Service de Microbiologie animale.)*

Il y a longtemps déjà que l'on a reconnu la réceptivité du rat blanc à la brucellose expérimentale et Ber [1] a donné en 1936 une description très complète des lésions qui font suite à l'inoculation intrapéritonéale de cultures. Mais les variations individuelles de cette réceptivité sont si grandes ou, pour mieux dire, les cas individuels de résistance se présentent si fréquemment dans cette espèce, qu'elle n'est généralement pas employée au laboratoire.

Nous nous sommes proposé de rechercher des moyens propres à exalter le pouvoir pathogène des brucelles pour le rat blanc de race commune dans une mesure qui permette de vaincre la résistance constatée chez un trop grand nombre de sujets. Pour nous placer dans les conditions les meilleures, mettant à profit les observations d'Ascoli [2] d'une part, de Pugh [3] d'autre part, nous n'avons inoculé que des femelles ayant atteint ou dépassé l'époque de la maturité sexuelle.

### **I. — INOCULATIONS INTRAPÉRITONÉALES DE CULTURES MICROBIENNES ADDITIONNÉES DE MUCINE.**

Nungester, Wolf et Jourdonais [4] ont montré en 1932 que l'addition de mucine à des cultures de pneumocoques, de streptocoque hémolytique, de staphylocoque doré, déterminait l'exaltation de leur virulence après injection dans le péritoine. Des constatations analogues ont été faites depuis avec un grand nombre de bactéries. En ce qui concerne les brucelles, les expériences de Dishon et Olitzki [5] ont confirmé ces résultats chez la souris blanche.

Nous avons fait usage de suspensions microbiennes normales de cultures sur gélose âgées de 4 jours ; la plupart des essais ont

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1<sup>er</sup> octobre 1953.

été pratiqués avec de la mucine Miller délayée dans 19 parties d'eau, puis stérilisée par chauffage. On mélangeait parties égales de suspension microbienne et de mucine délayée ; les inoculations étaient pratiquées quelques instants après, dans la cavité péritonéale, à raison de 2 cm<sup>3</sup> par animal (soit un peu moins de 10 000 000 000 de germes). On a établi qu'injectée seule, par la même voie, la mucine ne déterminait aucun trouble.

a) « *Br. abortus* » dépourvue de pouvoir pathogène pour la vache (souche vaccinale). — Dans trois essais principaux, 10 rats ont reçu la suspension microbienne non additionnée de mucine ; ils sont tous morts dans des délais compris entre trente-quatre et cinquante-huit jours. Les ensemencements ont mis la brucelle en évidence chez tous. Six d'entre eux ne présentaient aucune lésion ; on a relevé chez les autres un degré léger de splénomégalie, d'hépatomégalie ou de dégénérescence du foie.

D'autre part, 10 rats ont reçu la même suspension additionnée de mucine ; ils sont tous morts dans des délais compris entre sept et cinquante-six jours et 4 dans les trois semaines qui ont suivi l'inoculation. Trois d'entre eux ne présentaient aucune lésion, 4 présentaient de la splénomégalie ; chez l'un il y avait adhérence hépato-splénique ; chez un autre, mort après dix jours, le développement de la rate était considérable et le foie portait 2 petits abcès. Les ensemencements ne permirent de retrouver la brucelle que chez 5 de ces animaux.

Enfin dans des essais accessoires d'inoculation avec mucine, il a été relevé chez un rat mort après vingt-six jours une collection purulente à brucelles, du volume d'une noix, dans la cavité thoracique et chez un rat sacrifié après trois mois et demi un abcès hépatique brucellique de la grosseur d'un petit pois.

b) « *Br. abortus* » douée d'un pouvoir pathogène faible. — Dans trois essais comportant l'emploi de mucine, 16 rats ont été inoculés ; 14 sont morts dans des délais compris entre deux et quatorze jours, dont 7 dans les quatre premiers jours. Les ensemencements ont été positifs pour 13 d'entre eux ; tous, excepté un, présentaient des lésions congestives ou dégénératives de la rate et du foie et plusieurs des lésions de péritonite avec dépôt fibrineux ou adhérences viscérales. A noter encore des lésions de pleuro-pneumonie dans 2 cas, d'entérite dans 2 cas, d'inflammation des cornes utérines dans 1 cas.

D'autre part, dans six essais comportant l'emploi de mucines diverses, d'action moins régulière, 28 rats ont été inoculés, dont 21 sont morts dans des délais compris entre un et trente-sept jours, 10 dans les quatre premiers jours, 14 dans les quinze premiers jours. La brucelle a été retrouvée par ensemencement chez 20 d'entre eux. Indépendamment des lésions signalées chez les animaux du groupe précédent, on a relevé des formations purulentes remarquables : nombreux petits abcès dans la rate, le foie, le



myocarde (animal mort le onzième jour) ; abcès coalescents des poumons (animal mort le quinzième jour) ; gros abcès péritonéal (animal mort en vingt-quatre jours) ; abcès du rein de la grosseur d'une noisette et chapelet d'abcès en boules d'ivoire le long des cornes utérines (animal mort en vingt-sept jours) ; gros abcès du rein (animal mort en trente-sept jours).

En résumé, sur un ensemble de 44 rats inoculés, 36 sont morts, soit près de 80 p. 100. Les  $\frac{2}{5}$  des morts se sont produites dans les quatre premiers jours, les  $\frac{3}{4}$  dans les quinze premiers jours ; parmi les animaux morts ensuite, 4 sur 7 présentaient d'importantes collections purulentes.

c) « *Br. abortus* » douée d'un pouvoir pathogène élevé. — Dans un premier essai, 10 rats reçoivent une suspension microbienne non additionnée de mucine ; ils meurent tous dans des délais compris entre deux jours et dix-huit jours ; 10 autres rats reçoivent la même suspension additionnée de mucine : 8 d'entre eux meurent dans des délais compris entre un et huit jours, un autre après quatre mois ; le dernier survit. La brucelle est retrouvée, par ensemencement, dans tous les cadavres et tous présentent des lésions, lésions caractéristiques d'une toxi-infection brutale chez ceux qui meurent rapidement, avec réaction du foie, de la rate, des reins chez les autres et péritonite fibrineuse chez plusieurs. Le rat qui meurt tardivement, après quatre mois, présente des amas de volumineux abcès mésentériques.

Dans un deuxième essai, 6 rats reçoivent la suspension microbienne sans mucine ; l'un meurt après quatre-vingt-deux jours, le poumon gauche transformé en une masse purulente de 3 cm de diamètre, riche en brucelles ; les autres survivent. Six autres rats reçoivent la même suspension additionnée de mucine ; 5 meurent du cinquante et unième au soixante-troisième jour, ne présentant que des séquelles discrètes mais porteuses de brucelles ; le dernier survit.

Il ressort de ces expériences et d'essais complémentaires diversément ordonnés, qu'en général la maladie évolue plus rapidement vers la mort chez les rats qui reçoivent la suspension mêlée de mucine et que chez ceux d'entre eux qui résistent à l'infection, les réactions péritonéales sont particulièrement violentes.

d) « *Br. melitensis* ». — Six rats reçoivent un mélange de suspension microbienne et de mucine. Ils meurent dans des délais compris entre quatre et trente-sept jours. La brucelle est retrouvée dans 5 d'entre eux par ensemencement. Méritent d'être signalées les lésions suivantes, indépendamment des altérations habituelles du foie, de la rate, des reins et des altérations accessoires du poumon et du myocarde : un abcès de l'épiploon (rat mort le quatrième jour) ; une splénomégalie considérable (rat mort le huitième jour) ; de multiples abcès du foie (rat mort le trente-quatrième jour).

Dans un autre essai semblable, 2 rats morts les trentième et quarante-quatrième jours ont présenté eux aussi des abcès du foie.

## II. — INOCULATIONS INTRAPÉRITONÉALES DE PUS OU DE BROYATS D'ORGANES BRUCELLIQUES ADDITIONNÉS DE MUCINE.

Le matériel microbien, pus ou broyat d'organes abcédés, a été prélevé sur des cadavres de rats morts de brucellose expérimentale ; on ne l'employait qu'après un séjour de durée variable à la glacière, après s'être assuré qu'il contenait des brucelles et à l'état de pureté.

Seule a été mise en œuvre une souche de *Br. abortus* de pouvoir pathogène faible et bien adaptée à l'aérobiose.

a) *Pus puisé au sein d'abcès brucelliques du rat.* — Le pus dilué au 1/20 était mélangé à un volume double de mucine Miller au 1/20 ; on inoculait 1,5 cm<sup>3</sup> du mélange dans le péritoine. Huit rats ont été ainsi traités dans trois essais distincts ; ils sont tous morts, l'un deux jours après, les autres dans des délais compris entre vingt-six et soixante-cinq jours, dont 5 aux environs du quarantième jour. Il est remarquable qu'à l'exception du premier tous ces animaux portaient un gros abcès du foie ; l'un d'eux présentait en outre de multiples abcès péritonéaux avec adhérence viscérale ; chez un autre, mort le soixante-cinquième jour, on a relevé un abcès de la rate de la grosseur d'une noisette et un abcès de la paroi abdominale ouvert à l'extérieur.

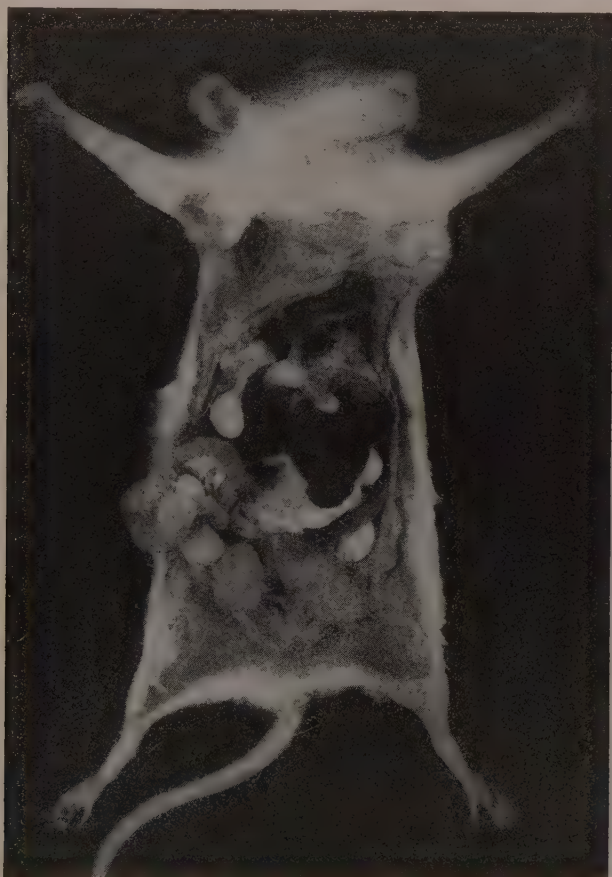
En même temps que deux des rats précédents recevaient le mélange pus-mucine, deux rats recevaient le même pus non additionné de mucine ; ils sont morts tous les deux aussi et dans des délais plus courts (vingt-deux et trente-neuf jours contre quarante-cinq et soixante-cinq jours) ; mais il faut noter qu'ils étaient atteints de gale généralisée, circonstance de nature à aggraver l'évolution de l'infection brucellique expérimentale comme d'autres observations nous l'ont montré. Contrairement à ce qui a été relevé chez tous les précédents, ces deux rats, qui n'avaient pas reçu de mucine, portaient de graves lésions thoraciques : abcès du médiastin, de la grosseur d'une noix chez l'un, poumon criblé d'abcès punctiformes chez l'autre.

b) *Broyat de parenchyme rénal criblé de petits abcès en formation.* — Le broyat dilué au 1/30 était mélangé à deux volumes de mucine Miller au 1/20. On inoculait 1,5 cm<sup>3</sup> dans le péritoine.

En deux essais, 8 rats ont été inoculés ; tous sont morts dans des délais compris entre six et quarante-deux jours, la plupart entre le trentième et le quarantième jour. A l'exception du premier qui ne présentait que de la congestion des divers organes, tous portaient des lésions purulentes massives dans la cavité thoracique, la cavité abdominale, ou les deux à la fois. Voici, à titre d'exemples, quelques observations succinctes :

*Rat mort le seizième jour* : Abscès en chapelets sur le bord de la rate et le long des cornes utérines ; le foie porte deux abscesses, le rein droit un, le rein gauche quatre.

*Rat mort le trente-sixième jour* : Un abcès dans le poumon,



*Rat mort de brucellose expérimentale* après inoculation dans le péritoine de pulpe rénale additionnée de mucine. Nombreux et volumineux abscesses dans la cavité abdominale.

un abcès à la surface du foie ; une importante collection de pus enrobe la rate.

*Rat mort le trente-neuvième jour* : De nombreux et volumineux abscesses déforment la surface du cœur et du foie, d'autres sont logés entre cœur et poumon ; le péritoine porte des séries d'abcès globuleux. Le ganglion précrural gauche est abcédé.

Dans un troisième essai, deux rats ont reçu, mélangée à de la mucine, la substance d'un gros abcès rénal en formation, prélevé extemporanément. Ils sont morts en quinze et trente-six jours ; chez l'un et l'autre on a relevé, notamment, d'abondantes collections purulentes dans la cavité thoracique et encore un ganglion précrural abcédé.

c) *Broyat de parenchyme hépatique abcédé.* — Un seul essai a été effectué selon le protocole indiqué ci-dessus, 4 rats ont reçu 1,5 cm<sup>3</sup> du mélange ; ils sont morts entre le cinquante-cinquième et le soixante-dix-huitième jour porteurs de lésions analogues à celles que nous avons décrites dans le paragraphe précédent, mais de moindre importance.

### III. — INOCULATIONS INTRACARDIAQUES DE CULTURES MICROBIENNES OU DE MATÉRIEL ORGANIQUE BRUCELLIQUE.

Diverses souches de brucelles ont été successivement employées. La plupart des animaux ont reçu un mélange de matériel microbien et de mucine, mais leur comportement n'a pas différé sensiblement de celui des témoins qui avaient reçu le matériel microbien sans mucine, et il ne sera pas tenu compte autrement de ce détail expérimental.

a) *Souche vaccinale de « Br. abortus », employée sous forme de culture sur gélose de quatre jours.* — On inocule 0,25 cm<sup>3</sup> d'une suspension normale, dans le ventricule gauche (soit un peu moins de 2 500 000 000 de germes). En trois essais, 15 rats ont été inoculés ; tous sont morts de brucellose dans des délais compris entre trente-cinq et soixante et onze jours, à l'exception d'un seul qui est mort neuf jours après l'inoculation. Chez 5 d'entre eux on a relevé un léger degré de splénomégalie et chez un plus grand nombre de la dégénérescence aiguë du foie ; dans un tiers des cas, l'aspect du cadavre était macroscopiquement normal.

b) *Souche pathogène de « Br. abortus », employée sous la même forme que la précédente.* — En trois essais, 11 rats ont été inoculés et sont morts de brucellose dans des délais compris entre deux et vingt-deux jours, dont 6 entre le sixième et le douzième jour. Des altérations de la rate et du foie s'observent sur presque tous les cadavres ; il s'y ajoute sur presque tous aussi de l'engouement pulmonaire et sur plusieurs des foyers d'entérite aiguë. Mais surtout on relève dans 3 cas une péri-cardite massive avec de larges adhérences des feuilletts entre eux et du feuillet externe avec le poumon ou la paroi costale ; enfin, des abcès sont observés dans le rein (rat mort le deuxième jour), le foie (rat mort le onzième jour), le long des cornes utérines (rat mort le treizième jour).

c) *Souche pathogène de « Br. abortus », employée sous forme*



*de pus ou de parenchyme rénal lésé.* — Le matériel microbien, pus ou broyat rénal, a été employé en suspension au 1/20.

En trois essais, 9 rats ont reçu une suspension de parenchyme rénal ; tous sont morts dans des délais compris entre deux jours et demi et vingt-trois jours, dont 7 dans les douze premiers jours.

En trois essais, 12 rats ont reçu une suspension de pus ; tous sont morts de brucellose dans des délais compris entre trois et treize jours, dont 9 dans les cinq premiers jours.

Les lésions relevées sur les cadavres sont importantes ; elles intéressent de façon constante la rate, le foie, les reins, le poumon, le cœur et, moins régulièrement, le tractus génital et l'intestin. Exemples :

*Rat mort en quatre jours* (broyat rénal + mucine) : splénomégalie très accusée, le foie, congestionné, porte deux abcès bien distincts ; amas d'abcès à la base du cœur, sous le péricarde, avec péricardite adhésive ; un abcès pulmonaire.

*Rat mort en trois jours* (pus + mucine) : splénomégalie, hépatite aiguë dégénérative avec alternance de bandes groseille et feuille morte ; pneumonie rouge arborescente ; myocardite dégénérative ; rein décoloré criblé d'abcès punctiformes ; entérite aiguë.

Ce qui est particulièrement remarquable, c'est que presque tous les animaux morts dans les cinq premiers jours, et dès le deuxième jour, ont les reins criblés de micro-abcès décelables sur les coupes ou d'abcès punctiformes nettement apparents. Il est à noter aussi que, indépendamment des vastes collections purulentes qui se constituent plus ou moins rapidement, et à point de départ péricardique, on observe chez plusieurs animaux morts en quatre ou cinq jours des abcès du volume d'un grain de mil ou même d'un grain de blé, diversement localisés (cœur, foie, poumon, ovaire). Il est évident que les inoculations ainsi pratiquées, et avec le matériel choisi, déterminent une septico-pyémie brucellique immédiate.

**INOCULATIONS COMPARATIVES DANS LE CŒUR ET DANS LE PÉRITOINE.** — Parmi les essais d'inoculation intracardiaque, qui font l'objet de la relation ci-dessus, plusieurs ont été doublés d'essais d'inoculation dans le péritoine, ceux-ci comportant chaque fois l'emploi du même matériel virulent que ceux-là. Au total, 13 rats ont été inoculés par voie cardiaque (dont 9 avec broyat rénal et 4 avec pus) et 16 par voie péritonéale (dont 10 avec broyat rénal et 6 avec pus). Dans les deux groupes, tous les animaux ont contracté une brucellose mortelle, mais tandis que dans le premier les morts se sont produites entre le deuxième et le vingt-troisième jour avec prédominance légère dans les cinq premiers jours (8/13), dans le deuxième elles se sont succédé du deuxième au quarante-cinquième jour avec forte prédominance au delà du

vingt-cinquième (12/16). Les abcès ou amas d'abcès présentaient, dans l'ensemble, un plus grand développement chez les rats inoculés par voie péritonéale en raison des délais dont ils avaient disposé pour se développer.

#### CONCLUSIONS.

Chez le rat blanc femelle, l'inoculation dans le péritoine d'une culture de brucelles mélangée à de la mucine a généralement pour effet d'abréger le processus infectieux ; elle éveille ou intensifie les réactions péritonéales ; elle favorise la formation de collections purulentes dans les divers parenchymes et sous les séreuses ; elle cause le plus souvent, quoique non régulièrement, un accroissement de la léthalité, le taux de celle-ci pouvant être facilement porté à 75 ou 80 p. 100.

L'injection par la même voie de pus à brucelles mélangé à de la mucine, ou de broyat de parenchyme porteur d'abcès brucelliques et de mucine, détermine une brucellose qui entraîne la mort dans des délais ordinairement compris entre trente et quarante jours. Le processus est caractérisé par la formation quasi constante de masses importantes de pus riche en brucelles. La maladie évolue, d'ordinaire, plus rapidement après injection de parenchyme rénal abcédé qu'après injection de pus en nature ; et elle se traduit anatomiquement par la formation de lésions plus nombreuses et plus largement réparties.

L'inoculation intracardiaque de brucelles est particulièrement sévère chez le rat blanc. Lorsqu'on injecte une culture de brucelles pathogènes, la léthalité est toujours élevée et la mort se produit dans de courts délais. Lorsqu'on injecte une suspension de pus ou de parenchyme rénal lésé, le processus est également bref et la mort est de règle ; une septicopyémie brucellique s'établit immédiatement, dont les manifestations anatomiques sont apparentes dès le deuxième jour chez certains sujets.

D'une manière générale, lorsqu'on fait usage d'un même matériel, la maladie évolue plus rapidement après inoculation intracardiaque (deux à vingt-trois jours) qu'après inoculation intrapéritonéale (deux à quarante-cinq jours) ; quelle que soit la voie adoptée, la substance des reins criblés de petits abcès en formation est un matériel de choix qui permet l'obtention de lésions nombreuses et diversement réparties.

Il apparaît ainsi que, sous certaines modalités, l'inoculation au rat blanc de matériel microbien est suivie d'effets assez rapides, constants et précis pour autoriser l'emploi de ce petit animal dans l'étude expérimentale des brucelloses. Il va de soi que les résultats varient selon le pouvoir pathogène de la culture microbienne ou le pouvoir infectieux du matériel pathologique, lui-même fonction et de la qualité des germes et de l'âge des lésions.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BER. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 845.
- [2] A. A. ASCOLI. *Veter. Med.*, 1946, **41**, 396.
- [3] L. H. PUGH. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 591.
- [4] W. J. NUNGESTER, A. A. WOLF et L. F. JOURDONAIS. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1932, **30**, 120.
- [5] T. DISHON et L. OLITZKI. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 698.

# NOUVELLES RECHERCHES SUR L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-HISTOLYTICUM ET ANTI-SEPTICUM DE DIVERS SÉRUMS

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY.\*).

(Institut Pasteur.)

Après avoir démontré que la nocivité *in vivo* de quantités importantes de toxine histolytique est totalement supprimée par le sérum anti-septicum de beaucoup de chevaux ayant reçu de nombreuses injections de toxine septicum, nous avons établi que la toxine septicum est neutralisée par le sérum anti-histolyticum prélevé à divers chevaux maintenus longtemps en hyperimmunisation grâce à des injections régulières d'anatoxine histolytique [1, 2]. Ensuite, nous avons recherché si les propriétés antitoxiques, homologue et hétérologue, de chacun de ces anti-sérums complexes étaient additives [3]. Pour cela, nous avons ajouté à chaque sérum de la toxine septicum et, trente minutes après, de la toxine histolyticum ; trente minutes plus tard, nous avons injecté, par voie veineuse à des souris blanches de 17 à 20 g, les différentes solutions contenant un sérum et deux toxines ; nous avons alors noté les faits suivants.

La toxine septicum diminue l'activité anti-histolyticum *in vivo* des sérums anti-septicum ; elle diminue aussi celle des sérums anti-histolyticum complexes ; plus la quantité de toxine septicum initialement introduite dans les deux sortes de sérums est grande, plus l'activité anti-histolyticum *in vivo* de ceux-ci baisse. Autrement dit, les sérums mentionnés neutralisent d'autant moins de toxine histolyticum qu'ils sont additionnés au préalable de quantités plus grandes de toxine septicum. Ces résultats sont obtenus en expérimentant avec des sérums anti-septicum de chevaux en immunisation depuis quatorze à trente-deux mois (1)

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 1<sup>er</sup> octobre 1953.

(1) Dès que le titre antitoxique *in vivo* du sérum des chevaux que nous immunisons dépasse 100 unités internationales par millilitre, ces chevaux sont régulièrement saignés et injectés tous les mois dans les conditions habituelles. Volume de sang prélevé mensuellement : 12 à 14 litres. Le titre antitoxique de nos sérums est déterminé en présence de toxines très nécosantes précipitées par le sulfate neutre d'ammonium et desséchées [3]. La dose L + de ces toxines est recherchée en présence des sérums étalons internationaux.



et avec des sérums anti-*histolyticum* de chevaux en immunisation depuis *six à quarante-neuf mois*. Les antigènes injectés aux chevaux sont préparés avec la souche Feunten (*Cl. septicum*) et avec la souche Letivi (*Cl. histolyticum*).

Dans une autre série de titrages, réalisés sur une autre portion des mêmes sérums, nous avons ajouté à chaque sérum, d'abord, de la toxine histolytique, ensuite, de la toxine *septicum* ; puis les mélanges ont été injectés aux souris. D'après ces dosages, la toxine histolytique réduit le pouvoir anti-*septicum* des sérums anti-*septicum* et des sérums anti-*histolyticum* complexes : l'atténuation de ce pouvoir est d'autant plus marquée que la quantité de toxine histolytique préalablement mise dans les sérums est plus importante.

Pour contrôler la valeur de la méthode expérimentale qui nous a servi à étudier en présence de deux toxines différentes (*septicum* et *histolyticum*) l'activité des deux types d'immunsérums complexes que nous venons de signaler, nous avons titré, par le même procédé, un mélange de sérum anti-*septicum* spécifique et de sérum anti-*histolyticum* spécifique, ces antisérums spécifiques étant fournis par des chevaux en immunisation depuis peu de temps ; en comparant les résultats des dosages faits en présence de deux toxines avec les résultats que l'on obtient lorsque le mélange est titré vis-à-vis d'une seule toxine (*septicum* ou *histolyticum*), nous avons constaté, comme nous l'escomptions, que les propriétés antitoxiques d'un mélange de sérums spécifiques sont additives. Dans ce mélange, chaque anticorps réagit comme s'il était seul ; en effet, l'introduction d'une forte quantité de toxine *septicum* dans le mélange examiné ne modifie pas ou que très peu le pouvoir anti-*histolyticum* de celui-ci ; la toxine *septicum* n'altère donc pas l'affinité de l'antitoxine anti-histolytique pour la toxine histolytique. Réciproquement, la toxine histolytique, même à dose élevée, affaiblit peu l'activité anti-*septicum* du mélange. Notre procédé de titrage en présence de deux toxines s'avère donc correct. Il autorise à penser que les sérums complexes anti-*septicum* et anti-*histolyticum* des animaux en immunisation depuis longtemps diffèrent profondément d'un mélange de sérums spécifiques anti-*septicum* ou anti-*histolyticum*. L'opposition entre les résultats que nous avons indiqués tend à faire supposer que les deux propriétés antitoxiques *in vivo* des sérums complexes envisagés ne sont pas dues à deux anticorps nettement isolés, capables de réagir indépendamment l'un de l'autre, mais plutôt à un agrégat d'anticorps ; on peut supposer que la combinaison de cet agrégat avec la toxine *septicum* provoque une réduction des forces d'attraction et d'adhésion de l'agrégat pour l'antigène léthal et nécosant qui domine dans la toxine *histolyticum* (2) et, réciproquement, que l'agrégat supposé a peu d'affinité pour la toxine *septicum* après s'être combiné à la toxine *histolyticum*.

(2) En 1946, nous avons désigné cet antigène par la lettre  $\tau$  [4] ; en 1950, Oakley et Warrack l'ont appelé  $\alpha$  [4].

La toxine *septicum* en diminuant l'activité anti-*histolyticum*  $\alpha$  des sérums anti-*histolyticum* ne modifie pas *in vitro* leur titre anti-collagénasique  $\beta$  [3].

A la suite des titrages que nous venons de rapporter, nous avons envisagé la question suivante : le sérum des chevaux soumis depuis longtemps à des injections *simultanées* de toxine *septicum* et d'anatoxine *histolyticum* contient-il un agrégat antitoxique ayant de l'affinité pour les toxines nécrosantes *septicum* et *histolyticum*, ou bien des anticorps distincts, monovalents, aussi indépendants les uns des autres que ceux d'un mélange de sérum spécifique anti-*septicum* et de sérum spécifique anti-*histolyticum* ? Pour donner une réponse à cette question, il suffisait de disposer de chevaux normaux, de réaliser leur immunisation et de rechercher à intervalles réguliers si les propriétés anti-*septicum* et anti-*histolyticum* de chaque sérum prélevé étaient additives. Avant d'entreprendre cet essai, nous avons poursuivi l'étude des sérums que nous avions déjà ; ils provenaient des animaux suivants :

1° De chevaux ayant reçu pendant plusieurs mois des injections d'anatoxine histolytique, puis de nombreuses injections de toxine *septicum*.

2° De chevaux soumis pendant plusieurs mois à des injections d'antigènes *septicum* et, ultérieurement, à des injections *simultanées* d'antigènes *histolyticum* et *septicum*.

3° De bœufs préparés, au début, contre les antigènes *septicum*, ensuite, contre les antigènes *septicum* et *histolyticum*.

Nous allons brièvement indiquer le protocole du premier de ces modes d'immunisation et l'activité antitoxique de quelques sérums titrés dans différentes conditions. Dans un autre article, nous signalerons le titre du sérum des animaux soumis aux deux autres modes d'immunisation.

SÉRUMS DE CHEVAUX PRÉPARÉS D'ABORD CONTRE LES ANTIGÈNES  
DE *Cl. histolyticum*,  
PUIS CONTRE LES ANTIGÈNES DE *Cl. septicum*.

Les chevaux reçoivent, pendant trois à quatre mois, des injections d'anatoxine *histolyticum* (première immunisation), puis, trois injections préparatoires d'anatoxine *septicum* et, ensuite, uniquement des injections de toxine *septicum* (deuxième immunisation). De petites quantités de sang sont prélevées fréquemment pour suivre les progrès de l'immunisation ; lorsque les sérums recueillis atteignent un titre suffisant, les chevaux sont soumis aux conditions suivantes : tous les mois, saignées de 12 à 14 l, puis inoculations des antigènes.

Les titres anti-*histolyticum* et anti-*septicum* de tous les sérums sont d'abord recherchés par le procédé international, dont voici le principe : à des volumes décroissants du sérum à titrer, on ajoute un poids précis de toxine *histolyticum* ou de toxine *septicum* suivant que l'on veut évaluer le titre anti-*histolyticum*

ou le titre anti-septicum du sérum. Tous les mélanges sont amenés au même volume par addition d'eau physiologique, laissés quarante-cinq minutes à 37°, puis, injectés par voie veineuse à des souris de 17 à 20 g ; chaque mélange inoculé contient donc le sérum étudié et une toxine.

ACTIVITÉ ANTITOXIQUE DES SÉRUMS TITRÉS DANS LES CONDITIONS INTERNATIONALES. — En comparant les titres antitoxiques *in vivo* des sérums prélevés fréquemment aux chevaux en immunisation, nous avons fait les constatations suivantes :

a) Les injections d'anatoxine histolytique ne déclenchent qu'un faible passage d'antitoxine anti-histolyticum  $\alpha$  dans le sérum des 4 chevaux suivants : 585, 384, 379, 881. b) Les taux de cet anticorps sont déjà en régression dans le sérum de ces 4 animaux lorsque la deuxième immunisation est entreprise. c) Les sérums récoltés quelques semaines après le début de la deuxième immunisation, ainsi que ceux que l'on prélève pendant les mois suivants, présentent des propriétés anti-septicum très nettes, ce qui est normal, mais, fait inattendu, ils manifestent une activité anti-histolyticum *in vivo* supérieure à celle qu'ils avaient à la fin de la première immunisation.

Les exemples suivants illustrent ces faits.

Premier exemple. — Le cheval 585 reçoit des injections d'anatoxine histolytique pendant quatre mois ; le titre antitoxique maximum atteint par le sérum de ce cheval, au cours de cette immunisation, est de 25 unités internationales anti-histolyticum (U. I. anti-hist.). Le sérum prélevé à la fin de cette immunisation titre seulement 5 à 10 U. I. (3). Cinquante-sept jours après avoir cessé les injections d'anatoxine histolytique et commencé les injections de toxine septicum, le sérum du cheval titre 80 à 100 U. I. anti-hist., 200 à 300 U. I. anti-

(3) L'anatoxine histolytique employée pour l'immunisation avait cependant une valeur antigénique certaine car elle déterminait rapidement chez d'autres chevaux une forte émission d'anticorps spécifiques : en effet, les sérums prélevés à ces chevaux trois ou quatre mois après le début de cette immunisation titraient fréquemment plus de 300 U. I. anti-histolyticum (souris, veines). Tous nos sérums anti-histolytiques neutralisent très efficacement la collagénase histolytique  $\beta$ . Il suffit d'employer 1/4 000 ml de certains d'entre eux pour supprimer l'effet de deux doses minima collagénasiques de toxine histolytique (titrage *in vitro*, en milieu tamponné à pH 6,5, en présence de collagène A comme dans nos expériences sur la collagénase *perfringens* kappa [5]). Des sérums présentant une telle activité anticollagénasique  $\beta$  inhibent la collagénase élaborée par *B. cereus* var. *alesti*, agent pathogène de la fiacherie des vers à soie ; mais il faut 1/200 ml de ces antisérums pour neutraliser deux doses minima collagénasiques de culture *cereus*, âgée de trois jours, filtrée sur bougie L2. Un de nos sérums anti-*perfringens* (capable à la dose de 1/4 000 ml de neutraliser deux doses minima collagénasiques de toxine *perfringens*) doit

sept. ; cinq mois après le début de la deuxième immunisation le sérum du cheval titre 40 à 50 U. I. anti-hist., 125 à 150 U. I. anti-sept. ; ces derniers résultats sont notés dans les quatrième et deuxième colonnes du tableau I.

**TABEAU I. — Activité antitoxique du sérum de différents chevaux préparés, d'abord, contre les antigènes de *Cl. histolyticum* (première immunisation) puis contre ceux de *Cl. septicum* (deuxième immunisation). Titres exprimés en unités internationales par ml de sérum ; titrages sur souris, injections intraveineuses.**

Numéro des Sérums	Titre anti-septicum déterminé en présence		Titre anti-histolyticum déterminé en présence	
	d'une seule toxine : sept.	de deux toxines : hist. et sept.	d'une seule toxine : hist.	de deux toxines : sept. et hist.
585 " 5 mois "	125 - 150	<u>5 - 10</u> .. (35 hist.)	40 - 50	< 2 ... [125 sept.] 5 ... [40 sept.]
384 " 20 mois "	100		180	< 2 ... [90 sept.]
384 " 30 mois "	90	<u>3 - 4</u> .. (110 hist.)	120	< 3 ... [75 sept.] 15 ... [60 sept.]
379 " 7 mois "	80 - 100	<u>5 - 10</u> .. (35 hist.)	40 - 50	<u>10-15</u> .. [80 sept.]
881 " 5 mois "	100 - 110	<u>25 - 30</u> .. (110 hist.)	110 - 120	<u>15-20</u> .. [100 sept.]
881 " 9 mois 1/2 "	180	<u>20 - 30</u> .. (250 hist.) <u>80 - 100</u> .. (180 hist.)	250 - 260	<u>30</u> .... [160 sept.]
881 " 14 mois "	250 - 300		600 - 800	
881 " 19 mois "	220		450	<u>20</u> .... [200 sept.]

Sept., *septicum*; hist., *histolyticum*.

Entre guillemets : temps écoulé entre le début de la deuxième immunisation et le prélèvement de chaque sérum noté dans ce tableau.

Entre parenthèses : nombre d'unités anti-histolyticum, par ml de sérum, saturées de toxine histolytique avant d'évaluer, en présence de toxine vibron septique, l'activité anti-septicum du mélange obtenu.

Entre crochets : nombre d'unités anti-septicum, par ml de sérum, saturées de toxine vibron septique avant d'évaluer, en présence de toxine histolytique, l'activité anti-histolyticum du mélange obtenu.

être employé à la dose de 0,01 ml pour neutraliser deux doses collagéniques de culture *cereus* filtrée. Nous remercions vivement M. Toumanoff de nous avoir donné plusieurs tubes de culture de *B. cereus* var. *alesti*. A la dose de 0,4 ml, les filtrats de ces cultures dissolvaient totalement en moins de vingt-quatre heures, à 37°, une pastille de collagène A de 0,100 mg. Aux doses de 0,2 et 0,1 ml, ils provoquaient une dissolution partielle en quarante-huit heures, à 37° ; la dissolution n'augmentait que légèrement à 37° pendant les deux jours suivants.



*Deuxième exemple.* — Le cheval 881 reçoit pendant trois mois des injections d'anatoxine histolytique. Au cours de cette immunisation le sérum du cheval titre au maximum 50 U. I. anti-hist. ; le sérum prélevé à la fin de l'immunisation titre 25 à 30 U. I. anti-hist. Cinquante-sept jours après le début de la deuxième immunisation, le sérum du cheval 881 titre 100 à 150 unités anti-hist., 75 à 100 U. I. anti-sept. ; neuf mois et demi après avoir commencé cette deuxième immunisation, le sérum prélevé au cheval titre 250 à 260 U. I. anti-hist., 180 U. I. anti-sept. Les saignées qui sont faites les douzième, treizième, quatorzième mois de cette immunisation fournissent du sérum titrant 600 à 800 U. I. anti-hist., 250 à 300 U. I. anti-sept. ; le sérum récolté le dix-huitième mois de l'immunisation titre 500 à 600 U. I. anti-hist., 250 U. I. anti-sept. Le sérum prélevé le mois suivant titre 450 U. I. anti-hist., 220 U. I. anti-sept.

*Troisième exemple.* — Après avoir reçu pendant quatre mois des injections d'anatoxine histolytique (première immunisation), le cheval 384 reçoit, pendant les trente-trois mois suivants, des injections de toxine *septicum* (deuxième immunisation), ensuite, pendant douze mois, des injections d'anatoxine *œdematiens* (troisième immunisation), puis, à nouveau, des injections de toxine *septicum* (quatrième immunisation). Nous avons signalé ces deux dernières immunisations parce que les observations qu'elles nous ont permis de faire facilitent l'interprétation des phénomènes observés pendant la deuxième immunisation.

Cinquante jours après le début de la première immunisation, le sérum du cheval contient 50 à 75 U. I. anti-hist. ; à la fin de cette immunisation, le sérum prélevé titre seulement 10 à 25 U. I. anti-hist. Cinquante-sept jours après le début de la deuxième immunisation, le sérum recueilli titre 100 à 150 U. I. anti-hist., 100 U. I. anti-sept. ; le dix-huitième mois de l'immunisation, le sérum fourni par le cheval titre 150 à 200 U. I. anti-hist., et, aussi, 150 à 200 U. I. anti-sept. ; le trentième mois de l'immunisation, le sérum du cheval titre 120 U. I. anti-hist. ; 90 U. I. anti-sept. Pendant la troisième immunisation (au cours de laquelle il n'est injecté que de l'anatoxine *œdematiens*), l'immunité anti-histolyticum et anti-septicum du cheval baisse énormément : le sérum prélevé à la fin de cette troisième immunisation ne titre en effet que 5 à 10 U. I. anti-hist., 2 U. I. anti-sept. Par contre, dix-huit jours seulement après le retour aux injections de toxine *septicum* (quatrième immunisation commencée quarante-six mois après l'arrêt des injections d'anatoxine anti-histolytique), le sérum du cheval titre déjà 550 à 600 unités anti-hist., 375 à 400 U. I. anti-sept. ; trois mois après, le cheval fournit du sérum qui titre 600 à 800 U. I. anti-hist., 400 à 500 U. I. anti-sept. Pendant les quatre mois suivants, les sérums prélevés au cheval titrent 400 à 500 U. I. anti-hist. (titrages sur souris) ; *in vitro*, ces immunsérums [6] n'abouissent pas plus efficacement que des sérums normaux les propriétés collagénasique, gélatinolytique et hémolytique (4) de la toxine histolytique.

(4) Au sujet de l'hémolysine de *Cl. histolyticum*, signalons que Bowen [7] a confirmé des notions que nous avons énoncées en 1942-1950 [8] ; nos recherches ont, entre autres, mis en évidence que cette

*Remarques.* — Après cette brève énumération des faits que nous avons observés en titrant le sérum de différents chevaux préparés d'abord contre les antigènes de *Cl. histolyticum* puis contre ceux de *Cl. septicum*, examinons les déductions qui ont été tirées des recherches faites dans d'autres directions.

Il est bien connu que lorsqu'on interrompt l'immunisation d'un animal ayant reçu de nombreuses injections d'un antigène donné, le taux de l'anticorps correspondant diminue nettement dans le sérum de l'animal ; la diminution est rapide pendant les premiers mois qui suivent l'arrêt des injections ; elle est plus lente pendant les mois ultérieurs. Les auteurs anglais, après avoir signalé que beaucoup de chevaux employés dans la production des sérums anti-diphthériques et anti-tétaniques continuent pendant longtemps à fournir de l'antitoxine après la cessation de l'immunisation spécifique, ont précisé que le taux de l'antitoxine trouvé dans le sang un an environ après la dernière injection d'antigène est en relation avec le nombre d'injections préalablement faites aux chevaux et avec le titre antitoxique des sérums au moment de la suppression des injections [9].

Chez l'animal immunisé, la vie moyenne d'une molécule d'anticorps étant très brève (Schœnheimer, Ratner, Rittenberg et Heidelberger, 1942 [40]), on admet qu'il se fait continuellement, même après l'arrêt des injections d'antigène, de nouvelles molécules d'anticorps dans l'organisme d'un animal à immunité persistante. C'est ainsi que Sédallian, Berger et Carraz [41] expliquent l'origine de l'antitoxine diphthérique présente à un taux relativement élevé dans le sérum de 3 chevaux non injectés depuis vingt-quatre à quarante-six mois, mais cependant soumis à des saignées importantes (chevaux ayant au préalable respectivement reçu pendant douze, vingt et un et vingt-huit mois des injections d'antigène diphthérique). Sédallian et ses collaborateurs considèrent que, chez leurs chevaux, de nouvelles globulines antitoxiques se sont reformées, probablement sur le moule des antitoxines résiduelles antérieures.

Dans le cadre des recherches que nous mentionnons dans le présent travail, 4 chevaux ont reçu des injections d'anatoxine histolytique pendant trois à quatre mois seulement ; les injections n'ont fait apparaître que peu d'antitoxine anti-*histolyticum*  $\alpha$  dans le sérum de ces 4 chevaux. Etant donné, d'une part, la durée minime de l'immunisation entreprise, d'autre part, la faible

hémolysine s'atténue rapidement au contact de l'air et que l'activité perdue pendant la conservation au froid est partiellement rétablie par réduction. Nous avons signalé, en outre, que les sérums anti-*perfringens* qui neutralisent l'effet hémolytique de la toxine histolytique précipitée par le sulfate d'ammonium ne suppriment pas l'action léthale de cette toxine, montrant ainsi que les deux activités examinées sont dues à deux substances différentes. Sigler, en 1939, avait envisagé qu'une seule substance était responsable des propriétés hémolytique et léthale des cultures *histolyticum* filtrées.

réponse des tissus producteurs d'antitoxine  $\alpha$ , il y avait lieu de penser qu'après l'arrêt des injections indiquées le taux de l'antitoxine anti-*histolyticum*  $\alpha$  deviendrait rapidement insignifiant dans le sérum des animaux lorsque ceux-ci seraient soumis à des saignées mensuelles de 12 à 14 l de sang. Or, après la suppression des injections, nous décelons au contraire un *accroissement de l'activité anti-histolyticum*  $\alpha$  du sérum des 4 chevaux énumérés. L'augmentation rapide et durable de l'immunité anti-*histolyticum* que nous observons est consécutive, rappelons-le, à des injections de toxine *septicum*; elle peut être considérée, croyons-nous, comme le résultat d'une réaction des chevaux aux nouvelles injections qu'ils reçoivent. La toxine *septicum*, en déclenchant une immunité anti-*septicum* détermine peut-être encore chez ces animaux une série de modifications qui favorisent la mise en circulation de l'antitoxine anti-*histolyticum* formée dans les tissus pendant la première immunisation; mais si une libération de cette nature se produit, elle n'est certainement que transitoire. Les résultats des titrages que nous avons signalés et spécialement ceux qui se rapportent aux chevaux 881 et 384, montrent, par contre, que l'immunité anti-*histolyticum*  $\alpha$  enregistrée après les injections de toxine *septicum* (deuxième immunisation) se maintient pendant plus de dix mois à une valeur importante. Ces faits révèlent-ils que la toxine *septicum* provoque rapidement chez les animaux en expérience la synthèse d'un constituant capable de supprimer par une action directe l'effet léthal de l'exotoxine *histolyticum*  $\alpha$ ? Signifient-ils simplement que la toxine *septicum* fait apparaître dans le sang des composés ayant la propriété d'augmenter le pouvoir neutralisant du sérum vis-à-vis de la toxine histolytique? D'après nos observations, tout antigène autre que la toxine *septicum* ne suscite pas la formation de tels composés chez l'animal injecté; par exemple, ni les inoculations d'anatoxine *perfringens*, ni celles d'anatoxine *œdematiens* à des chevaux ayant déjà reçu des injections d'anatoxine histolytique n'intensifient les propriétés anti-histolytiques *in vivo* du sérum de ces animaux. Les résultats obtenus après injection de toxine *septicum* engagent à supposer une *parenté antigénique entre les toxines septicum et histolyticum*: nous émettons l'hypothèse que la toxine *septicum* contient en quantité non négligeable l'antigène léthal et nécrosant  $\alpha$  qui existe en grande quantité dans la toxine histolytique et que les injections de toxine *septicum* peuvent, par suite, immuniser activement les chevaux contre cet antigène. La très forte activité anti-histolytique *in vivo* des sérums prélevés au cheval 384 pendant la durée de la quatrième immunisation — au cours de laquelle il n'est fait au cheval que des injections de toxine *septicum* — parle nettement en faveur de l'hypothèse que nous venons de

formuler (5). Cette hypothèse nous semble également appuyée par le fait que beaucoup de chevaux *normaux* (n'ayant jamais encore reçu d'injections d'antigènes d'aucune sorte et ne contenant pas, d'après les titrages sur souris, d'antitoxine anti-*histolyticum*  $\alpha$  dans leur sérum au moment où ils sont mis en observation) deviennent capables de procurer pendant longtemps du sérum de titre anti-*histolyticum*  $\alpha$  important (6) lorsqu'ils reçoivent des *injections répétées de toxine septicum*. Certains chevaux particulièrement réceptifs fournissent même des sérums qui titrent jusqu'à 140, 200 et même 300 U. I. anti-*hist.* par millilitre ainsi qu'on peut le voir dans la moitié supérieure du tableau II (7). D'après nos contrôles, quatre heures de chauffage à 56° n'affaiblissent pas plus l'activité anti-*histolyticum* que le titre anti-*septicum* du sérum de chevaux ayant reçu de nombreuses injections de toxine *septicum*.

Avant d'essayer de séparer et de purifier les différents constituants de la toxine *septicum*, nous avons poursuivi *in vitro* et *in vivo* l'examen des sérums provenant de chevaux préparés d'abord contre les antigènes de *Cl. histolyticum* (première immunisation), puis contre les antigènes de *Cl. septicum* (deuxième immunisation).

I. Parmi les faits que nous avons observés *in vitro* en laissant diffuser de la toxine *septicum*, *histolyticum* ou *cedematiens* dans différents sérums additionnés de gélose, nous citerons les deux suivants :

La toxine histolytique ne détermine aucune zone d'opalescence dans le sérum prélevé au cheval 881 le dix-neuvième mois après le début de l'immunisation contre les antigènes *septicum*, donc dix-neuf mois après la dernière injection d'anatoxine histolytique

(5) La rapidité avec laquelle l'immunité anti-*histolyticum* et anti-*septicum* devient intense chez cet animal après la reprise des injections de toxine *septicum* montre que l'empreinte laissée dans les cellules par les anciennes inoculations d'anatoxine histolytique et de toxine *septicum* persiste longtemps à un degré important.

(6) Après les premières injections de toxine *septicum*, le sérum des chevaux ne possède pas encore d'activité anti-*histolyticum* décelable *in vivo*, même lorsqu'il est déjà capable de neutraliser l'action léthale de quantités importantes de toxine *septicum* ; mais, après de nombreuses injections de cette toxine, beaucoup de chevaux procurent du sérum à la fois anti-*septicum* et anti-*histolyticum in vivo*. Les tissus producteurs d'anticorps réagissent donc rapidement à l'antigène dominant de la toxine *septicum* et créent à la longue une immunité anti-*histolyticum*  $\alpha$  efficace.

(7) Dans la moitié inférieure de ce tableau, nous indiquons la double activité antitoxique *in vivo* du sérum de différents chevaux qui ne reçoivent que des injections d'anatoxine histolytique. La comparaison des deux parties de ce tableau est intéressante.



TABLEAU II. — **Activité antitoxique du sérum de différents chevaux préparés contre les antigènes *septicum* ou contre les antigènes *histolyticum*. Titres exprimés en unités internationales par ml de sérum (titrages sur souris, voie veineuse).**

Numéro des Sérums	Durée de l'immunisation du cheval donneur	Activité antitoxique du sérum	
		Titre anti-septicum	Titre anti-histolyticum
Chevaux uniquement préparés contre les antigènes septicum			
932	13 mois	1800	200 - 300
956	13 mois	600 - 800	10 - 20
969	14 mois 1/2	800	140
293	19 mois	800 - 1000	300 - 400
151	25 mois 1/2	550 - 600	160
481	27 mois	800	20 - 40
482	27 mois	800 - 1000	140
483	27 mois	400 - 500	80 - 100
163	35 mois	600 - 800	140 - 150
Chevaux uniquement préparés contre les antigènes histolyticum			
1011	6 mois	I	800 - 1000
1008	8 mois	15 - 20	1200 - 1500
1084	11 mois	15	800 - 1000
882	14 mois	40 - 60	2000
1012	15 mois	< 0,5	1200 - 1500
1008	16 mois	5	800 - 1000
886	20 mois	5 - 10	1000 - 1200
557	49 mois	30 - 40	800
391	59 mois	2 - 5	1000 - 1200
393	61 mois	2	600 - 800

(ce sérum titre 450 U. I. anti-*hist.* : tableau I, quatrième colonne). Par contre, la toxine histolytique fait apparaître six zones de précipitation dans le sérum des chevaux hyperimmunisés recevant depuis longtemps, à des dates régulières, des injections d'anatoxine histolytique ; tel est le cas, par exemple, dans les expériences réalisées avec le sérum anti-*histolyticum* prélevé au cheval 1009 le dix-huitième mois de l'immunisation : ce sérum titre 450 U. I. anti-*hist.* comme le sérum 881 précédemment cité (le titre anti-*septicum* du sérum 1009 atteint seulement 1 à 2 unités, alors que celui du sérum 881 s'élève à 220 unités).

Pour comparer les sérums 881 et 1009 en milieu gélosé, nous avons adopté les modifications apportées par J. Munoz et E. L. Becker [42] à la technique de J. Oudin [43]. Nous avons introduit dans des tubes de 3 mm de diamètre : a) 0,1 ml d'immunsérum (881 ou 1009) additionné de 0,1 ml de sérum normal de cheval et de 0,2 ml de gélose à 0,6 p. 100 ; b) 14 mg de toxine histolytique (en solution dans 0,2 ml d'eau physiologique). La dose L+ de cette toxine est égale à 0,53 mg.

II. Au cours des recherches *in vivo*, nous avons voulu nous rendre compte :

1° Si la toxine *septicum* diminue beaucoup l'activité anti-*histolyticum* des sérums prélevés pendant la deuxième immunisation ; 2° si la toxine histolytique affaiblit beaucoup l'activité anti-*septicum* des mêmes sérums.

Au cours des titrages effectués pour établir le premier point, le sérum est additionné, d'abord, de toxine *septicum*, puis, de toxine *histolyticum*. Pour établir le deuxième point, une autre portion de sérum est additionnée d'abord de toxine *histolyticum* puis de toxine *septicum*. Dans les 2 cas, chaque mélange contient donc le sérum étudié et 2 toxines : *septicum* et *histolyticum*.

#### ACTIVITÉ DES SÉRUMS ADDITIONNÉS DE DEUX TOXINES.

Nous avons signalé à la page 518 d'un article récent [3] les détails expérimentaux du titrage d'un sérum en présence de deux toxines : *septicum* et *histolyticum* ; nous en rappellerons ici quelques-uns avant d'indiquer les résultats des titrages actuels.

#### A. — ACTIVITÉ ANTI-*histolyticum* DES SÉRUMS PRÉALABLEMENT ADDITIONNÉS DE TOXINE *septicum*.

*Technique* : A des volumes égaux du sérum à titrer, répartis dans des verres, nous ajoutons la même quantité de toxine *septicum* pour supprimer une partie de l'activité anti-*septicum* du sérum (le nombre placé entre crochets, dans la cinquième colonne du tableau I, indique combien cette quantité de toxine sature d'unités anti-*septicum* par millilitre de sérum) ; nous mettons ensuite des quantités décroissantes d'eau physiologique dans les différents verres ; trente minutes plus tard, nous introduisons des quantités croissantes de toxine histolytique dans les divers mélanges, sauf dans un qui servira de témoin. Tous les mélanges ont alors le même volume ; après trente minutes d'étuve, ils sont injectés à des souris par voie veineuse : les uns s'avèrent inoffensifs, d'autres mortels pour les souris ; le mélange, qui neutralise la plus grande dose de toxine histolytique, permet d'apprécier le titre anti-*histolyticum* d'un sérum préalablement additionné de toxine *septicum*.

*Résultats* : 1° Le sérum 585, prélevé cinq mois après le début de la deuxième immunisation, est additionné de la quantité de toxine *septicum* qui supprime l'activité de 125 unités anti-*septicum* ; son titre anti-*histolyticum* est ensuite inférieur à 2 unités (tableau I, cinquième colonne).

2° Le sérum 384, prélevé vingt mois après l'arrêt des injections d'anatoxine histolytique, est additionné de la dose de toxine *septicum* qui inhibe 90 unités anti-*septicum*, c'est-à-dire 90 p. 100 de l'activité anti-*septicum* qu'il possède ; ce sérum titre alors moins de 2 U. I. anti-*hist.* ; son efficacité anti-*histolyticum*, de même que celle du sérum précédent, est donc empêchée par une forte dose de toxine *septicum*. Ces deux sérums se

comportent par conséquent comme les sérums complexes des chevaux n'ayant reçu pendant longtemps que des injections de toxine *septicum* (8).

D'après ces résultats, il semble rester bien peu d'antitoxine anti-*histolyticum* libre dans les sérums 585 et 384 respectivement prélevés le cinquième et le vingtième mois après l'arrêt de l'immunisation spécifique des chevaux.

Le sérum 384, prélevé trente mois après la suppression des injections d'anatoxine histolytique, titre moins de 3 U. I. anti-*histolyticum* lorsqu'il est additionné de la dose de toxine *septicum* qui sature 75 U. I. anti-*septicum*, soit 83 p. 100 de l'activité anti-*septicum* du sérum ; il ne titre que 15 U. I. anti-*histolyticum* lorsqu'il est mis en présence de la dose de toxine *septicum* qui inhibe seulement 66 p. 100 de l'activité anti-*septicum* du sérum (9) [avant l'addition de toxine *septicum*, il titrait 120 U. I. anti-*histolyticum*].

3° Les sérums 379 et 881 du tableau I, récoltés sept mois, neuf mois et demi et dix-neuf mois après la cessation des injections d'anatoxine histolytique, diffèrent appréciablement des précédents : *ils possèdent un reliquat très notable d'activité anti-histolyticum lorsqu'une très grande partie de leur pouvoir anti-septicum est abolie par addition de toxine septicum* [14].

En effet le sérum 379, prélevé sept mois après la fin de la première immunisation, titre encore 10 à 15 U. I. anti-*histolyticum* lorsqu'il est préalablement additionné de la quantité de toxine *septicum* qui inhibe 80 U. I. anti-*septicum* (10). Le sérum 881, prélevé neuf mois et demi après l'arrêt de la première immunisation, titre 30 U. I. anti-*histo-*

(8) Les données numériques groupées dans le tableau I d'un précédent article [3] montrent, en effet, que 4 sérums complexes provenant de chevaux ayant reçu *uniquement* des injections de toxine *septicum* titrent moins de 3 unités anti-*histolyticum* lorsqu'ils sont préalablement additionnés de la dose de toxine *septicum* qui annule 90 p. 100 environ de leur pouvoir anti-*septicum* ; il s'agit des sérums 483, 151, 677, 166. Le premier a été prélevé le quatorzième mois de l'immunisation ; le deuxième, le vingt-sixième mois ; le troisième, le dix-septième mois, et le quatrième, le trente-deuxième mois de l'immunisation.

(9) Le sérum 384 prélevé dix-huit jours après la quatrième immunisation, donc quarante-six mois après la suppression des injections d'anatoxine histolytique, perd en moyenne 80 p. 100 de son efficacité anti-*histolyticum* lorsque nous supprimons seulement 50 à 53 p. 100 de son pouvoir anti-*septicum* par addition de toxine *septicum*.

(10) Pendant la première immunisation, le sérum du cheval 379 a atteint le titre maximum de 50 U. I. anti-*histolyticum* ; à la fin de cette immunisation, le cheval 379 fournissait du sérum contenant seulement 25 à 30 U. I. anti-*histolyticum* par millilitre (titrages selon la méthode internationale).

*lyticum*, lorsque 160 U. I. anti-*septicum* du sérum (sur 180) sont saturées de toxine *septicum* (il titre 250 à 260 U. I. anti-*histolyticum* en l'absence de toxine *septicum*). Le sérum 881, récolté le dix-neuvième mois après la fin de la première immunisation (11), titre 20 U. I. anti-*histolyticum* en présence de la dose de toxine *septicum* qui supprime 90 p. 100 de l'activité anti-*septicum* qu'il possède (il titre 450 U. I. anti-*histolyticum*, en l'absence de toxine *septicum*). Il existe donc dans ces antisérums une petite quantité d'antitoxine anti-*histolyticum* capable de manifester son activité en présence d'une forte dose de toxine *septicum*.

B. — TITRE ANTI-*septicum* RÉSIDUEL DES SÉRUMS ADDITIONNÉS DE TOXINE HISTOLYTIQUE. — Le tableau I montre que le titre anti-*septicum* des sérums diminue de 75 à 96 p. 100 lorsqu'on leur ajoute assez de toxine *histolyticum* pour inhiber 77 à 98 p. 100 de leur activité anti-*histolytique* (12).

EXEMPLE. — Le sérum 881, prélevé neuf mois et demi après le début de la deuxième immunisation, titre 20 à 30 U. I. anti-*septicum* lorsqu'il est additionné de la quantité de toxine *histolyticum* qui bloque 250 U. I. anti-*histolyticum* ; il titre 80 à 100 U. I. anti-*septicum* en présence de la dose de toxine *histolytique* qui sature seulement 180 U. I. anti-*histolyticum* (en l'absence de toxine *histolytique*, il titre 180 U. I. anti-*septicum*).

De ces observations et de celles du paragraphe A, il ressort nettement que le nombre total d'unités antitoxiques existant dans chaque sérum examiné n'est pas égal à la somme des activités partielles (anti-*septicum* et anti-*histolyticum*) que la méthode internationale permet d'évaluer.

Mais, tandis que les deux premiers sérums mentionnés (585 et 384) ressemblent à des sérums complexes de chevaux préparés uniquement contre les antigènes de *Cl. septicum*, les autres sérums (379 et 881) paraissent présenter une complexité plus grande ; d'après les résultats notés dans les troisième et cinquième colonnes du tableau I, il semblerait que les sérums 379 et 881, prélevés plus de six mois après le début de la deuxième immunisation des chevaux, contiennent une faible quantité d'antitoxine anti-*septicum* (capable de neutraliser seulement la toxine correspondante), une faible quantité d'antitoxine anti-*histolytique*  $\alpha$  (réagis-

(11) Il a été retiré 220 l de sang au cheval 881 pendant les dix-neuf mois qui ont suivi la fin de la première immunisation.

(12) L'activité anti-*septicum* des sérums complexes des chevaux ayant reçu pendant quatorze à trente-deux mois uniquement des injections de toxine *septicum* diminue en moyenne de 90 p. 100 lorsque ces antisérums sont préalablement additionnés de la quantité de toxine *histolytique* qui inhibe les 8 à 9 dixièmes de leur activité anti-*histolyticum*. Voir à ce sujet le tableau I de notre article précédent [3].



sant seulement avec la toxine homologue) et une quantité importante d'un anticorps bivalent ayant de l'affinité pour les deux toxines étudiées; cet anticorps particulier paraît d'autant plus perdre de son affinité pour l'une des deux toxines qu'il est additionné d'une quantité plus grande de l'autre toxine.

#### RÉSUMÉ.

Les résultats des premières recherches établissent que l'action létale de la toxine *histolyticum* est supprimée par le sérum de beaucoup de chevaux ayant reçu de nombreuses injections de toxine *septicum*. Des exemples numériques précisent, en unités internationales, le titre anti-*histolyticum* très élevé atteint par divers sérums prélevés à des chevaux treize à trente-cinq mois après le début des injections de toxine *septicum* (quatrième colonne du tableau II). Les sérums des chevaux uniquement préparés contre les antigènes élaborés par *Cl. septicum* perdent leur activité hétérologue anti-*histolyticum* lorsqu'ils sont additionnés de la dose de toxine *septicum* qui supprime 90 p. 100 de leur pouvoir anti-*septicum*.

Certains chevaux ayant reçu des injections d'anatoxine histolytique pendant trois ou quatre mois puis de nombreuses injections de toxine *septicum* procurent pendant longtemps des sérums dont l'activité anti-*histolyticum* *in vivo* est très appréciable en présence de la quantité de toxine *septicum* qui abolit 90 p. 100 environ de leur pouvoir anti-*septicum*; de tels immunsérums neutralisent relativement peu de toxine *septicum* lorsqu'ils sont mis en présence d'une forte dose de toxine *histolyticum*: en effet, si la quantité de toxine *histolyticum* initialement ajoutée aux sérums annule les 8 ou 9/10 de l'activité anti-*histolyticum* de ceux-ci, le titre anti-*septicum* diminue de 80 à 90 p. 100 (titrages sur souris, injections intraveineuses).

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE. *Ces Annales*, 1946, **72**, 814 et 818; *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 436; *Rev. Immunol.*, 1952, **16**, 257.
- [2] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER, M. GEOFFROY et G. READE. *Ces Annales*, 1952, **83**, 360.
- [3] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER, M. GEOFFROY et G. READE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 516.
- [4] C. L. OAKLEY et G. H. WARRACK. *J. gen. Microb.*, 1950, **4**, 365.
- [5] M. GUILLAUMIE, S. MRCEVITCH, M. DELAUNAY et G. BÉCOULET. *Ces Annales*, 1950, **78**, 190 et 201.
- [6] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER, M. GEOFFROY et G. READE. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **256**, 429.
- [7] H. E. BOWEN. *Yale J. Biol. Med.*, 1952, **25**, 131.

- [8] M. GUILLAUMIE. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **67**, 389. Ces *Annales*, 1942, **68**, 84 ; 1944, **70**, 86 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **146**, 140 ; ces *Annales*, 1950, **79**, 661.
- [9] MOLLIE BARR et A. T. GLENNY. *Lancet*, 1947, **2**, 647.
- [10] R. SCHOENHEIMER, S. RATNER, D. RITTENBERG et M. HEIDELBERGER. *J. Biol. Chem.*, 1942, **144**, 541 et 555.
- [11] P. SÉDALLIAN, M. BERGER et M. CARRAZ. *Rev. Immunol.*, 1952, **16**, 390.
- [12] J. MUNOZ et E. L. BECKER. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 47.
- [13] J. OUDIN. Thèse doct. ès sciences, Paris, 1949. Ces *Annales*, 1948, **75**, 30 et 109.
- [14] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY. *VI<sup>e</sup> Congrès international de Microbiologie*, Rome, 6-12 septembre 1953.

# ISOLEMENT D'UN VIRUS ENCEPHALOMYELITIQUE A BRAZZAVILLE

## II. — ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE

par Aimé PELLISSIER (\*).

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

Nous avons rapporté ici même, avec Trinquier [4], l'étude épidémiologique et expérimentale du virus encéphalomyélique isolé à Brazzaville des selles et du liquide céphalo-rachidien de jeunes malades présentant un syndrome clinique de poliomyélite.

Nous avons poursuivi pendant plus de deux années l'étude de ce virus dont la caractérisation immunologique a été faite par comparaison avec 32 virus neurotropes divers. Nous avons pratiqué les épreuves de séro-neutralisation croisée et les épreuves de fixation croisée du complément.

### I. — Virus étudiés.

Notre étude comparative a porté sur 4 virus isolés à Brazzaville et donnant une infection neurotrope à la souris, sur 10 virus africains, sur 4 virus sud-américains et sur 14 virus divers. Tous ces virus présentent des affinités neurotropes, au moins pour la souris.

*Virus brazzavillois ou « aëjiens ».*

*Virus de l'ictère épidémique d'A. E. F.* — Ce virus ictérogène, isolé en 1948 par Pellissier et Lumaret [2, 3] en Oubangui, a été par la suite retrouvé à Brazzaville et au Tchad [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Inoculé à la souris par voie intracérébrale, ce virus produit une méningo-encéphalite qui tue l'animal au cours de crises convulsives le huitième jour. Après 39 passages de cerveau à cerveau de souris, la DL50 est obtenue avec une dilution à 1/600 000.

*Virus « Allenopithecus ».* — Ce virus a été isolé en 1952 du système nerveux d'un singe *Allenopithecus nigroviridis* présentant des signes d'encéphalite et une paralysie de la patte inférieure gauche. La souris, inoculée dans le cerveau, présente en trente-six à quarante-huit heures des signes de méningo-encéphalite avec hydrocéphalie déjà prononcée.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 juin 1953.

Après 12 passages de cerveau à cerveau de souris, la DL50 est obtenue avec une dilution à 1/10 000 [9 bis].

*Virus de cobaye E. R.* — Ce virus de cobaye, appelé E. R. à cause de la présence d'enclaves rosées (au Macchiavello) dans les monocytes de l'exsudat péritonéal, a fait l'objet d'une note préliminaire de Pellissier, Ceccaldi et Arnoult [10]. L'adaptation neurotrope à la souris détermine une méningo-encéphalite mortelle en six à huit jours. Après le trente-quatrième passage de cerveau à cerveau de souris, la DL50 est obtenue avec une dilution à 1/500 000 [10 bis].

*Virus cobaye pulmonaire.* — Ce virus de cobaye, appelé « pulmonaire » à cause des lésions pulmonaires particulières constatées dans la maladie naturelle, est transmissible en série à la souris par voie intracérébrale. Il occasionne une méningo-encéphalite tuant l'animal en six à huit jours. Après 29 passages sur souris, la DL50 est obtenue avec une dilution à 1/200 000. L'étude de ce virus sera faite dans une note ultérieure.

#### *Virus d'Afrique tropicale.*

*Virus amaril. Souche française neurotrope.* — Souche de fièvre jaune isolée en 1928 par Mathis, Sellards et Laigret [41] sur *M. rhesus* et adaptée à la souris en 1930 par Max Theiler [42].

*Virus de la fièvre de la vallée du Rift.* — C'est en 1931 que Daubney, Hudson et Garnham [43] ont rattaché à un même virus une hépatite enzootique sévissant dans les troupeaux et une maladie fébrile constatée chez les fermiers. Mackenzie et Findlay [44] ont obtenu une souche neurotrope chez la souris.

*Virus de la fièvre de Bwamba.* — Isolé en 1937 dans la région de Bwamba, en Ouganda, par Smithburn, Mahaffy et Paul [45]. Plusieurs souches ont été isolées par inoculation intracérébrale à la souris de sang d'Africains présentant une maladie fébrile.

*Virus West Nile.* — Isolé en 1937 dans le district de West Nile, en Ouganda, par Smithburn, Hughes, Burke et Paul [46], par inoculation intracérébrale à la souris de sérum d'une femme présentant de la fièvre. Ce virus a montré une parenté immunologique avec les virus de l'encéphalite de Saint-Louis et de l'encéphalite japonaise B entre les mains de Smithburn [47] et de Casals [48]. Ces relations immunologiques n'ont pas été retrouvées au cours des récents travaux de Smithburn [49] et de Kerr [20].

*Virus de la forêt de Semliki.* — Isolé en 1942 par Smithburn et Haddow [21] et étudié par Smithburn, Mahaffy et Haddow [22]. Le matériel d'isolement était constitué par un broyat filtré sur Seitz de 130 moustiques *Aedes abnormalis* capturés dans la forêt de Semliki, en Ouganda.

Bugher et Macnamara [23] ont isolé en 1948, au Cameroun britannique, sous le nom de « Kumba virus », par inoculation à la souris d'un broyat de moustiques du genre *Eretmapodites*, un virus qui a été reconnu identique au virus de Semliki par Smithburn [49] et Kerr [20].

*Virus de Bunyamwera.* — Isolé en 1943 par Smithburn, Haddow et Mahaffy [24] par inoculation à la souris d'un broyat de moustiques du genre *Aedes* capturés dans la région de Bunyamwera, en Ouganda.

*Virus de N'Taya.* — Isolé en 1943 par Smithburn et Haddow [25]



par inoculation à la souris du broyat d'un mélange de moustiques capturés dans la région de N'Taya en Ouganda.

*Virus de l'encéphalomyélite de Mengo.* — Isolé et étudié par Dick, Smithburn et Haddow [26], Dick [27] et par Dick, Best, Haddow et Smithburn [28] en 1946, dans le district de Mengo en Ouganda. La souche initiale fut isolée sur souris du L. C.-R. et de la moelle d'un *M. rhesus* neuf qui fut trouvé paralysé. D'autres souches ont été isolées de divers moustiques, d'une mangouste et d'un cas humain de maladie fébrile par contamination de laboratoire.

Le virus de Mengo fait partie d'un groupe de virus dont le virus encéphalomyocarditique, que nous allons retrouver plus loin, est le chef de file. Entrent encore dans ce groupe :

Le virus S. K. Columbia obtenu sur cobaye par Jungeblut, Sanders et Feiner [29, 30] à l'occasion d'essai de transmission à ce rongeur de la souche S. K. Yale de virus poliomyélitique.

Le virus M. M. isolé par Jungeblut et Dalldorf [31] par inoculation intracérébrale au hamster de la moelle d'un sujet mort cliniquement d'une poliomyélite bulbaire.

Ce groupe de 4 virus possède une identité immunologique complète, mise en évidence par Dick [32] et par Varren, Smadel et Russ [33].

*Virus de Zika.* — Isolé en 1947 par Dick du sang d'un *M. rhesus*, puis par Kitchen et Haddow d'un lot d'*Aedes africanus* capturés dans la forêt de Zika en Ouganda (Dick, Kitchen et Haddow [34]).

*Virus Uganda S.* — Isolé en 1947 par Dick et Haddow [35] d'un lot de moustiques du genre *Aedes* capturés dans la région de Bwamba en Ouganda.

#### *Virus d'Amérique tropicale.*

*Virus Anopheles A.* — Isolé en 1944 par Roca-Garcia [36] en Colombie par inoculation à la souris d'un lot de moustiques *Anopheles boliviensis* capturés en forêt dans l'est de ce pays.

*Virus Anopheles B.* — Isolé en 1944 par Roca-Garcia [36] en Colombie d'un lot de moustiques *A. boliviensis*.

*Virus Wyeomyia.* — Isolé en 1944 par Roca-Garcia [36] en Colombie par inoculation à la souris d'un lot de moustiques *Wyeomyia melanocephala* capturés en forêt.

*Virus de l'encéphalite d'Ilheus.* — Isolé en 1944 à Ilheus, au Brésil, par Laemmert et Hughes [37] et étudié par Koprowski et Hughes [38]. L'isolement fut obtenu par inoculation d'un mélange de moustiques des genres *Aedes* et *Psorophora*.

#### *Virus divers.*

*Virus encéphalomyocarditique.* — Isolé en 1945 par Helwig et Schmidt [39] et étudié par Warren et Smadel [40]. L'isolement eut lieu en Floride à partir d'un chimpanzé mort subitement et présentant une myocardite interstitielle diffuse. Nous avons vu les relations de ce virus avec le virus de Mengo. Ce groupe de virus paraît assez répandu dans le monde, puisque Smadel et Warren [41] ont trouvé des tests de séroneutralisation positifs avec des sérums provenant d'une épidémie de maladie fébrile accompagnée de réaction méningée et survenue en 1946 à Manille.

*Virus de l'encéphalite de Saint-Louis* (souche Hubbard). — Virus isolé en 1933 au cours de l'épidémie d'encéphalite sévissant dans la ville de Saint-Louis dans le Missouri, sur *M. rhesus*, par Muckenfus, Armstrong et Mac Cordock [42] et sur souris par Webster et Fite [43].

*Virus de l'encéphalomyélite américaine de l'Est* (souche Massachussets). — Virus isolé en 1933 par Ten Broeck et Merrill [44] et par Giltner et Shahan [45] au cours de l'épizootie sévissant chez le cheval et le mulet. Retrouvé en 1938 chez l'homme par Fothergill, Dingle, Faber et Connerly [46] et par Webster et Wright [47].

*Virus de l'encéphalomyélite américaine de l'Ouest* (souche Californie). — Virus isolé en 1930 par Mayer, Haring et Howitt [48] au cours d'une épizootie du cheval. Retrouvé en 1938 chez l'homme par Howitt [49] et par Eklund et Blumstein [50].

*Virus de l'encéphalomyélite du Vénézuéla*. — Virus isolé en 1938 par Beck et Wyckoff [51] et par Kubes et Rios [52] au cours d'une épizootie du cheval. Retrouvé chez l'homme en 1943 par Casals, Curnen et Thomas [53] et par Lennette et Koprowski [54].

*Virus de l'encéphalite japonaise type B*. — Virus d'une encéphalite humaine estivo-automnale isolé sur singe par Hayashi [55] et par Kasahara, Ueda, Okomoto et Yoshida [56]. La transmission à la souris fut obtenue en 1935 par Kawamura, Kodana, Ito, Yasaki et Kabayakawa [57] et par Tanigushi, Hosokawa et Kuya [58].

*Virus de l'encéphalite russe verno-estivale*. — Virus d'une encéphalite humaine extrême-orientale du printemps et de l'été isolé en 1937 par Silber et différencié du virus précédent par Silber et Soloviev [59].

L'identité immunologique de ce virus avec celui du louping-ill (voir ci-dessous) a été démontrée en 1944 par Casals [48] et récemment confirmée par Edward [60].

*Virus du louping-ill*. — Virus isolé du mouton en 1930 par Pool, Brownlee et Wilson [61] et retrouvé chez l'homme en 1934 par Rivers et Schwentker [62].

*Virus poliomyélitique Lansing*. — Virus chef de file des virus poliomyélitiques du type 2, adapté par Armstrong au sigmodon [63] puis à la souris [64].

*Virus poliomyélitique MEF1*. — Virus poliomyélitique du type 2 isolé en 1943 dans le Moyen-Orient par van Rooyen et Morgan [65] et caractérisé par Schlesinger, Morgan et Olitsky [66].

*Virus de l'encéphalomyélite de la souris ou de Theiler*. — Virus de l'encéphalomyélite spontanée de la souris découvert par Theiler en 1930 [67, 68]. La souche que nous avons étudiée est la souche GD VII isolée en 1940 par Theiler et Sven Gard [69].

*Virus de la chorio-méningite lymphocytaire*. — Il s'agit d'un virus neurotrope pathogène pour l'homme, le singe, le cobaye et la souris, isolé en 1933 par Armstrong et Lillie [70] au cours de leurs études sur l'encéphalite humaine de Saint-Louis. Traub [71] retrouve le même virus dans un élevage de souris blanches. Rivers et Scott [72] l'isolent du L. C.-R. de 2 cas de méningite humaine. En 1937, enfin, Lépigne, Mollaret et Kreis [73] reproduisent chez l'homme la maladie expérimentale. Nous avons étudié la souche WE isolée en 1936 d'un cas de méningite humaine par Rivers et Scott [74].

*Virus de la méningo-pneumonie*. — Isolé en 1936 par Francis et Magill [75] sur le furet à partir d'un liquide de lavage de gorge

d'un malade suspect de grippe. Ce virus appartient au groupe des « Miyagawella », groupe de virus dont les « corps élémentaires » sont visibles au microscope ordinaire et qui comprend entre autres les virus de la psittacose et de la maladie de Nicolas-Favre.

*Virus de la maladie de Nicolas et Favre* (souche KAM). — La lymphogranulomatose vénérienne a été isolée cliniquement en 1913 par Durand, Nicolas et Favre [76]. Le virus fut isolé sur le singe en 1930 par Hellerström et Wassen [77]. La transmission expérimentale à la souris fut obtenue par Levaditi, Ravaut, Lépine et M<sup>lle</sup> Schoen [78] et précisée par Levaditi, Ravaut et M<sup>lle</sup> Schoen [79]. Nous avons utilisé la souche KAM isolée par ces auteurs.

## II. — Epreuves de séro-neutralisation croisée.

La majorité des virus que nous avons étudiés sont susceptibles d'être transmis par un arthropode hématophage, et un certain nombre d'entre eux produisent une virémie intense chez l'animal inoculé ; aussi point n'est besoin d'insister sur les mesures de précaution prises pour éviter toute possibilité de diffusion. Les bocalux à souris sont fermés par un couvercle métallique porteur de grillage moustiquaire fin, et l'on veille à ce que ce couvercle soit toujours en place.

Nous avons fait pour chaque virus quelques passages de réadaptation avant d'en pratiquer le titrage. Ce sont les cerveaux du même passage qui a servi au titrage qui ont été par la suite utilisés pour les tests de séro-neutralisation et pour le titrage de l'anti-sérum correspondant. Ce qui fait que, même si pour quelques virus la dose létale 50 p. 100 (DL50) est inférieure à celle obtenue par d'autres auteurs, notre expérimentation garde toute sa valeur, car elle est fonction des caractéristiques biologiques du moment.

### OBTENTION DES ANTI-SÉRUMS.

Nous avons préparé les anti-sérums sur lapin en pratiquant six injections de 2 cm<sup>3</sup> d'une dilution du virus à 1/100, les trois premières sous-cutanées et les trois autres intrapéritonéales, injections faites tous les cinq jours. Pour les virus donnant une virémie chez le lapin, nous avons utilisé une dilution formolée à 5 p. 1 000. (Virus des encéphalomyélites équine de l'Est, de l'Ouest et du Vénézuéla ; encéphalite japonaise B ; encéphalite russe et loup-ill ; encéphalite de Saint-Louis ; encéphalite d'Ilheus et les virus de moustiques *Anopheles* A, *Anopheles* B et *Wyeomyia*.) Le lapin est saigné dix à quinze jours après la dernière injection.

Les anti-sérums ont été éprouvés vis-à-vis de 10, 100, 500 et 1 000 DL50. Pour la majorité des sérums la protection était d'au

moins 1 000 DL50. Pour quelques-uns nous avons obtenu seulement 500, mais ce chiffre est largement suffisant pour les épreuves de séro-neutralisation croisée.

Pour le virus amaril nous avons disposé d'un sérum d'ânesse provenant de l'Institut Pasteur de Dakar (D<sup>r</sup> Durieux).

#### TESTS DE SÉRO-NEUTRALISATION DU VIRUS ENCÉPHALOMYÉLITIQUE DE BRAZZAVILLE, SUR SINGE.

Tous les tests de séro-neutralisation du virus de Brazzaville ont été effectués avec la souche « Félix » à partir des cerveaux des singes 166 et 167, singes de l'isolement du virus. Ces cerveaux ont été conservés à  $-25^{\circ}$ , en glycérine à 50 p.100. Les derniers tests ont été faits avec le cerveau 166, ayant plus de deux ans de conservation et dont la virulence s'est conservée intacte.

Ce virus est actif à 1/160, mais ne l'est plus à 1/200. Il est difficile de déterminer la dose létale 50 p. 100 et, pour la séro-neutralisation, nous nous sommes arrêté à la dilution à 1/80 pour les raisons qui suivent.

Le mélange virus et sérum de lapin normal, laissé pendant deux heures à  $37^{\circ}$ , a donné les résultats suivants :

Virus à 1/20 + sérum (dilution finale 1/40) . . . . .	3	singes	paralysés	sur 3.
Virus à 1/40 + sérum (dilution finale 1/80) . . . . .	3	—	—	sur 3.
Virus à 1/80 + sérum (dilution finale 1/160) . . . . .	2	—	—	sur 2
Virus à 1/100 + sérum (dilution finale 1/200) . . . . .	0	—	—	sur 2

Les essais pratiqués avec un anti-sérum obtenu sur lapin et un anti-sérum obtenu sur singe *Cercocebus galeritus agilis* et avec des sérums de convalescents de Brazzaville ont donné une neutralisation totale du virus à 1/160 et à 1/80 (dilution finale) pour les sérums de convalescents et une neutralisation partielle du virus à 1/40 (dilution finale) pour les anti-sérums. Il nous a donc paru que la dilution finale du virus à 1/80, qui n'est pas neutralisée par le sérum de lapin normal, et qui est neutralisée par les sérums de convalescents (aucun singe paralysé sur 4 inoculés) devait convenir aux tests de séro-neutralisation. Le test est donc pratiqué avec un mélange à parties égales de virus à 1/40 et de sérum à expertiser, mélange laissé pendant deux heures à l'étuve à  $37^{\circ}$  et inoculé par voie intracérébrale.

#### TESTS DE SÉRO-NEUTRALISATION DES DIVERS AUTRES VIRUS, SUR SOURIS.

Pour ces virus, la dose DL50 a été facilement déterminée et nous avons pris comme test 10 DL50. Nous estimons en effet



qu'un anti-sérum qui ne neutralise pas 10 DL50 d'un virus ne possède aucun anticorps neutralisant pour ce virus et que, par conséquent, les deux virus en question sont immunologiquement différents.

Pour les tests qui sont pratiqués par inoculation intrapéritonéale (virus de Mengo, virus encéphalomyocarditique et virus de Semliki), le mélange virus-sérum est laissé pendant trente minutes à la température du laboratoire. Pour ces virus, Smithburn [19] a montré que les résultats de la séro-neutralisation étaient meilleurs quand on employait la voie intrapéritonéale.

Pour les tests qui sont pratiqués par inoculation intracérébrale (tous les autres virus étudiés), le mélange virus-sérum est laissé pendant deux heures à la température du laboratoire pour le virus de l'ictère épidémique d'A. E. F., et pendant deux heures à l'étuve à 37° pour tous les autres virus étudiés. Si l'inoculation ne peut être effectuée aussitôt la période d'incubation terminée, le mélange peut être conservé au frigidaire pendant plusieurs heures, et même jusqu'au lendemain.

### Résultats.

Le tableau I donne les résultats obtenus avec les épreuves de séro-neutralisation du virus encéphalomyélitique de Brazzaville (souche Félix). On pourrait s'étonner de voir que nous avons comparé au virus de Brazzaville, uniquement pathogène pour le singe, tout une série de virus pathogènes pour la souris. *A priori* il semble que nous ayons affaire à un virus différent de tous les autres, mais il convient cependant de ne pas oublier que le virus poliomyélitique Lansing, par exemple, actuellement régulièrement pathogène pour la souris, n'a pu être adapté à cet animal qu'après passages (d'ailleurs fort difficiles) sur le sigmodon. Comme nous n'avons pu disposer de rongeurs autres que la souris, il est toujours possible d'envisager une adaptation après passages sur le sigmodon, le hamster ou le mérion.

Aucun des anti-sérums étudiés n'a donné de neutralisation du virus à 1/80. A cette dilution, par contre, le virus est parfaitement neutralisé non seulement par les anti-sérums expérimentaux obtenus chez le lapin et chez le singe, mais encore par un mélange de sérums de convalescents de malades brazzavillois.

Nous avons obtenu enfin une bonne neutralisation avec un sérum de convalescents étiqueté « sérum de convalescents de poliomyélite » et reçu de la Direction du Service de Santé et de l'Hygiène de l'Angola (Dr Francisco Sines Do Amaral). Fin 1950, avait été enregistrée en Angola une poussée épidémique de « poliomyélite ». Nous pensons pouvoir dire qu'il est très vraisemblable qu'il s'agissait d'une encéphalomyélite de même nature

TABLEAU I. — Séro-neutralisation sur singe  
du virus encéphalomyélitique de Brazzaville.

SÉRUMS E PROUVES	VIRUS E.M. BRAZZAVILLE			
	Dilution: finale : I/40 : I/80 : I/160 : I/200			
Lapin normal.....	3/3	3/3	2/2	0/2
Singe anti E.M. Brazza...	1/2	0/2	0/2	
Lapin anti E.M. Brazza...	1/2	0/2		
Convalescents Brazza...	2/2	0/2		
Convalescents ANGOLA....		0/2		
Anti virus cobaye E.R. ...		2/2		
Anti virus cobaye Pulmon.		2/2		
Anti virus Allenopithecus:		2/2		
Anti ictère épidémique...		2/2		
Anti polio I.P. PARIS....		2/2		
Anti Swamba.....		2/2		
Anti West Nile.....		2/2		
Anti Semliki forest.....		2/2		
Anti Bunyamwera.....		2/2		
Anti N' Taya.....		2/2		
Anti Mengo.....		2/2	I/I	
Anti Zika.....		2/2		
Anti Uganua S .....		2/2		
Anti Rift Valley Fever...		2/2		
Anti amaril Dakar.....		2/2		
Anti Ilheus.....		2/2		
Anti Anopheles A .....		2/2		
Anti Anopheles B .....		2/2		
Anti Wyeomyia.....		2/2		
Anti E.M.A. de l'EST.....		2/2		
Anti E.M.A. de l'OUEST....		2/2		
Anti E.M.A. du VENEZUELA:		2/2		
Anti encéph. Saint Louis..		2/2		
Anti encéph. Japon. B ....		2/2		
Anti encéph. Russe.....		2/2		
Anti Louping ill.....		2/2		
Anti Polio. Lansing.....		2/2		
Anti THEILER GD VII .....		2/2		
Anti Chorio-méning-lymph.		2/2		
Anti Méningo-Pneumonie...		2/2		
Anti Nicolas-Favre.....		2/2		
Anti Encephalomyocardique:		2/2		

Numérateur, nombre de singes paralysés; dénominateur, nombre de singes inoculés.

que celle de Brazzaville. En effet, ce sérum de convalescent n'a aucun pouvoir neutralisant pour les virus poliomyélitiques Lansing et MEF1. Ajoutons que la réaction de déviation du complément confirme ces données : réaction positive avec le virus de Brazzaville et négative avec le virus Lansing.

Le tableau II donne les résultats de la séro-neutralisation, sur souris, des divers virus étudiés par le sérum anti-encéphalomyélite de Brazzaville. Nous y faisons figurer également les résultats des sérums expérimentaux des 4 autres virus isolés à Brazzaville.

TABLEAU II. — Séro-neutralisation sur souris  
des divers virus par les anti-sérums des virus brazzavillois.

VIRUS	Test :	Activité du virus	Pouvoir neutralisant : -za :	E.M. :	All. :	E.R. :	C.P. :	Ict-ère :
			homolog :					épi- :
			DL 50 :					déni-que :
<b>Virus d'A.E.F.</b>								
Allenopithecus.....	I.C. :	I/10.000 :	100 :	0/4 :	4/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Cobaye E.R. ....	I.C. :	I/500.000 :	500 :	0/4 :	0/4 :	4/4 :	0/4 :	0/4 :
Cobaye pulmonaire...	I.C. :	I/200.000 :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	4/4 :	0/4 :
Ictère épidémique...	I.C. :	I/600.000 :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	4/4 :
<b>Virus africains</b>								
Amaril Dakar.....	I.C. :	I/800.000 :	1000 :	0/8 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :
Rift Valley Fever...	I.C. :	I/50 Mill. :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Bwamba.....	I.C. :	I/200.000 :	1000 :	0/4 :	0/8 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
West Nile.....	I.C. :	I/10 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Semliki Forest.....	I.P. :	I/20 Mill. :	1000 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :	1/4 :	1/4 :
Bunyamwera.....	I.C. :	I/5 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :
N' Taya.....	I.C. :	I/800.000 :	500 :	1/4 :	1/4 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :
Mengo.....	I.P. :	I/30 Mill. :	1000 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Zika.....	I.C. :	I/1 Mill. :	500 :	1/4 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Uganda S.....	I.C. :	I/400.000 :	1000 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	1/4 :
<b>Virus américains</b>								
Anopheles A.....	I.C. :	I/300.000 :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Anopheles B.....	I.C. :	I/300.000 :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Wyeomyia.....	I.C. :	I/800.000 :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Ilheus.....	I.C. :	I/20 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
<b>Virus divers</b>								
Encéphalomyocardique:	I.P. :	I/20 Mill. :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
E.M.A. de l'EST.....	I.C. :	I/100 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
E.M.A. de l'OUEST.....	I.C. :	I/100 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
E.M.A. du VENEZUELA.	I.C. :	I/50 Mill. :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Encepn. Saint Louis.	I.C. :	I/100 Mill. :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Encepn. Russe.....	I.C. :	I/100 Mill. :	1000 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Encepn. Jap. B.....	I.C. :	I/50 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Louping ill.....	I.C. :	I/8 Mill. :	500 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Polio. Lansing.....	I.C. :	I/600 :	50 :	1/4 :	1/4 :	1/4 :	2/4 :	0/4 :
Polio. M.E.F.I.....	I.C. :	I/600 :	50 :	1/4 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :	1/4 :
THEILER GD VII.....	I.C. :	I/50 Mill. :	100 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :	0/4 :
Onco-meningite lymph.	I.C. :	I/500.000 :	500 :	0/4 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :
Meningo-Pneumonie...	I.C. :	I/500.000 :	500 :	1/4 :	0/4 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :
Nicolas-Favre.....	I.C. :	I/50.000 :	500 :	1/4 :	1/4 :	1/4 :	0/4 :	0/4 :

Test I.C., inocul. intracérébrale; I.P., inocul. intrapéritonéale; Mill., million; pouvoir neutral. sérum homolog., nb. de DL 50 neutralisées; numérateur, nombre de souris vivantes; dénominateur, nombre de souris inoculées.

Ces résultats montrent qu'il n'y a aucune relation immunologique entre ces divers virus et ceux de Brazzaville.

Nous avons enfin étudié les relations immunologiques entre les virus West Nile, encéphalite de Saint-Louis et encéphalite japonaise B. Avec le test de séro-neutralisation que nous avons pratiqué, test vis-à-vis de 10 DL50, on retrouve les relations décrites par Smithburn [47] et Casals [48].

Voici les résultats de cette expérimentation, en utilisant les mêmes notations que dans le tableau II :

VIRUS 10 DL 50	ANTI-SÉRUMS ÉPROUVÉS		
	Encéphalite japonaise B	Encéphalite Saint-Louis	West Nile
Encéphalite japonaise B. . . . .	4/4	4/4	2/4
Encéphalite Saint-Louis. . . . .	4/4	4/4	2/4
West Nile. . . . .	4/4	4/4	4/4

### III. — Epreuves de déviation croisée du complément.

La réaction de déviation du complément a été appliquée pour la première fois au diagnostic des infections neurotropes par Casals et Palacios [80]. C'est la technique de ces auteurs que nous avons employée.

Pour la préparation des antigènes, nous nous sommes servi de cerveau de singe pour le virus encéphalomyélitique de Brazzaville et de cerveau de souris pour tous les autres virus. Les anti-sérums neutralisants que nous avons obtenus chez le lapin ont également servi à la réaction de déviation du complément et se sont montrés dans l'ensemble très satisfaisants.

#### PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Casals et Palacios [80] et améliorée par Casals [81, 82] : c'est la méthode par congélations et décongélations successives. Le matériel technique dont nous disposions ne nous a pas permis d'utiliser la récente méthode de préparation des antigènes par extraction à l'acétone et à l'éther mise au point par Casals [83] et Casals, Anslow et Selzer [84] et utilisée par Kerr [85] dans sa dernière étude, en 1952.

Les antigènes ainsi préparés sont évidemment moins spécifiques, puisque moins purifiés, et contiennent une part d'antigène « cerveau de souris » qui réagit dans une certaine mesure avec l'anti-sérum préparé par injection de virus-cerveau de souris. Mais nous verrons que cet inconvénient, qui ne se rencontre d'ailleurs qu'avec les anti-sérums expérimentaux, peut être facilement éliminé par le titrage de l'antigène.

La méthode de Casals a été décrite pour le cerveau de souris, nous l'avons appliquée au cerveau de singe avec d'excellents résultats. Voici la technique que nous avons suivie, qui comporte certains aménagements de détails, nécessités par les moyens dont nous disposions.

On opère sur un mélange d'au moins 4 cerveaux de souris



fraichement prélevés et on les broie très soigneusement au mortier. On en fait ensuite une émulsion à 1/10 dans le mélange

Sérum de cobaye inactivé . . . . .	2 cm <sup>3</sup>
Eau physiologique à 8,5 p. 1 000 . . . . .	98 cm <sup>3</sup>

La suspension est laissée pendant la durée de la nuit au frigidaire et centrifugée, le lendemain matin, à 2 500 t/m pendant trente minutes. Le liquide surnageant, qui est opalescent, est réparti dans des tubes à essai sous le volume de 5 à 10 cm<sup>3</sup>. Ces tubes sont alternativement congelés et décongelés par immersion successive dans un bain réfrigérant et dans un bain à 37°. Chaque bain doit durer quinze minutes. Comme bain réfrigérant nous avons utilisé un mélange d'alcool méthylique absolu et de glace en petits cubes, ce mélange étant placé dans un récipient genre pot en grès et le tout à demeure au congélateur à —25°. L'opération de congélation et décongélation est répétée sept fois et le liquide est finalement centrifugé pendant une heure à 6 250 t/m.

Le liquide surnageant est prélevé à la pipette et mis dans de fins tubes à essai pour être exposé pendant deux heures aux rayons ultra-violets de la lampe germicide installée dans notre chambre à inoculation d'œufs. Pendant cette exposition, les tubes subissent un quart de tour tous les quarts d'heure. Finalement, l'antigène est additionné de merthiolate à 1/10 000.

Ce traitement est suffisant pour stériliser la plupart des antigènes ainsi préparés. Cependant, avec les virus des encéphalomyélites équine et en général avec les virus très actifs, il est en outre nécessaire d'ajouter du formol à 5 p. 1 000. Cette dose n'a pas un pouvoir anticomplémentaire assez fort pour être gênant.

Ces antigènes se conservent au moins six mois à —25° et au moins deux mois au frigidaire, à la suite de quoi leur titre baisse peu à peu.

#### TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

Nous avons utilisé la méthode de Kolmer (Kolmer et Boerner [86]), qui tend à devenir la méthode de référence pour la réaction de déviation du complément. Nous avons employé la « one-half », c'est-à-dire la technique utilisant des volumes moitié moins importants que dans la technique complète classique. La réaction est donc effectuée sur un volume total de 1,5 cm<sup>3</sup> au lieu de 3 cm<sup>3</sup>. La fixation est faite pendant dix-huit heures au frigidaire.

Les sérums à expertiser sont inactivés aux températures suivantes (Casals ; Kolmer et Boerner) pendant trente minutes :

à 56° pour les sérums de cobaye et de singe ;

à 60° pour les sérums d'homme et de souris ;

à 65° pour les sérums de lapin et de chien. Pour ce chauffage il convient de diluer le sérum à 1/2 pour éviter un début de coagulation.

Le sérum hémolytique anti-mouton s'emploie au même titre que celui qui est déterminé pour la réaction à l'antigène syphilitique.

Pour le *titrage de l'antigène* voici la technique que nous avons employée. Nous pratiquons un titrage du complément du jour en présence de l'antigène à titrer dilué à 1/4 (aucun des antigènes que nous avons préparés ne s'est montré anticomplémentaire à cette dilution). Nous pratiquons une réaction avec les différentes dilutions de l'antigène : de 1/2 à 1/128. Le sérum qui sert au titrage est le sérum expérimental de lapin dilué à 1/50. Fixation de dix-huit heures à + 4° comme d'habitude et incubation d'une heure au bain-marie à 37° après addition du système hémolytique. Lecture au bout de cette heure d'incubation.

A la lecture, nous notons les deux dilutions de l'antigène qui ont donné respectivement une réaction positive à + + + + et à + +. La dilution qui donne + + avec le sérum expérimental à 1/50 est le titre qui sera utilisé pour les réactions avec les sérums expérimentaux obtenus par inoculation de virus sous forme de cerveau de souris. En effet, à ce titre les anticorps anti-cerveau de souris sont éliminés et il ne persiste que les anticorps spécifiques, ou, plus exactement, seuls les anticorps spécifiques réagissent.

Le titre qui a donné + + + + est celui qui sera utilisé pour les réactions avec des sérums de convalescents et pour les enquêtes sérologiques systématiques. Il est apte à détecter une infime quantité de sensibilisatrice spécifique dans un sérum.

Par exemple, pour le virus de Mengo le titre de l'antigène est 1/128 pour les sérums expérimentaux et 1/32 pour les autres sérums.

#### RÉSULTATS.

La réaction de déviation croisée du complément confirme les résultats obtenus avec les épreuves de séro-neutralisation croisée. Il n'y a aucune parenté immunologique entre le virus de l'encéphalomyélite de Brazzaville et les 32 virus neurotropes qui lui ont été comparés.

La réaction a permis de confirmer les relations étroites entre les virus de Mengo et encéphalomyocardique, d'une part, et entre les virus de l'encéphalite russe verno-estivale et le louping-ill, d'autre part.

De même nous avons retrouvé une parenté immunologique entre l'encéphalite japonaise B, l'encéphalite de Saint-Louis et

le virus West Nile. Cette parenté avait été signalée par Smithburn [47] et par Casals [48]. Mais elle n'avait pas été retrouvée par Smithburn [49] ni par Kerr [85] au cours de leurs derniers travaux.

### Conclusions.

Nous avons poursuivi l'identification immunologique du virus encéphalomyélitique de Brazzaville en le comparant à divers virus neurotropes, dont :

- 4 autres virus d'Afrique Equatoriale Française ;
- 10 virus d'Afrique tropicale ;
- 4 virus d'Amérique tropicale ;
- 14 virus neurotropes divers.

Nous avons pratiqué les épreuves de séro-neutralisation croisée et les épreuves de déviation croisée du complément. Les résultats de cette expérimentation ont montré l'absence de toute parenté immunologique entre le virus encéphalomyélitique de Brazzaville et les 32 autres virus neurotropes auxquels il a été comparé.

Ces résultats confirment son individualité.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre gratitude à tous ceux qui nous ont aide dans ce travail en nous procurant les diverses souches et en nous prodiguant leurs conseils : P. Lépine et M<sup>lle</sup> Sautter, de l'Institut Pasteur de Paris ; E. S. Horgan, du Virus Research Institute de Entebbe ; G. W. A. Dick, K. C. Smithburn et P. K. Olitsky, de la Division of Medicine and Public Health of the Rockefeller Foundation de New-York ; J. E. Smadel, de l'Army Medical Service Graduate School, Washington ; F. A. Weiss, de l'American Type Culture Collection de Washington. Nous remercions enfin très vivement G. W. A. Dick, qui nous a autorisé à faire mention dans ce travail des virus de Zika et Uganda S, dont les publications originales d'isolement n'ont pas encore paru.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. PELLISSIER et E. TRINQUIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 316.
- [2] A. PELLISSIER et R. LUMARET. *Ces Annales*, 1948, **70**, 507.
- [3] A. PELLISSIER et R. LUMARET. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1949, **42**, 52.
- [4] A. PELLISSIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1949, **42**, 197.
- [5] A. PELLISSIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1950, **43**, 398.
- [6] A. PELLISSIER et E. TRINQUIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1952, **45**, 304.
- [7] A. PELLISSIER et E. TRINQUIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1952, **45**, 592.
- [8] A. PELLISSIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 24.
- [9] A. PELLISSIER. IV<sup>e</sup> Conférence internationale de Pathologie géographique. Liège, 1952.
- [9 bis] A. PELLISSIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 593.

- [10] A. PELLISSIER, J. CECCALDI et H. ARNOULT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 200.
- [10 bis] A. PELLISSIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 724.
- [11] C. MATHIS, A. SELLARDS et J. LAIGRET. *C. R. Acad. Sci.*, 1928, **186**, 604.
- [12] MAX THEILER. *Amer. J. trop. Med. Parasit.*, 1930, **24**, 249.
- [13] R. DAUBNEY et J. R. HUDSON. *J. Path. Bact.*, 1931, **34**, 545.
- [14] R. D. MACKENZIE et G. M. FINDLAY. *Lancet*, 1936, p. 140.
- [15] K. C. SMITHBURN, A. F. MAHAFFY et S. H. PAUL. *Amer. J. trop. Med.*, 1941, **21**, 75.
- [16] K. C. SMITHBURN, T. P. HUGHES, A. W. BURKE et J. H. PAUL. *Amer. J. trop. Med.*, 1940, **20**, 471.
- [17] K. C. SMITHBURN. *J. Immunol.*, 1942, **44**, 25.
- [18] J. CASALS. *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 341.
- [19] K. C. SMITHBURN. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 441.
- [20] J. A. KERR. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 461.
- [21] K. C. SMITHBURN et A. J. HADDOW. *J. Immunol.*, 1944, **49**, 141.
- [22] K. C. SMITHBURN, A. F. MAHAFFY et A. J. HADDOW. *J. Immunol.*, 1944, **49**, 159.
- [23] J. C. BUGHER et F. N. MACNAMARA. Kumba virus (sous presse).
- [24] K. C. SMITHBURN, A. J. HADDOW et A. F. MAHAFFY. *Amer. J. trop. Med.*, 1946, **26**, 189.
- [25] K. C. SMITHBURN et A. J. HADDOW. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **77**, 130.
- [26] G. W. A. DICK, K. C. SMITHBURN et A. J. HADDOW. *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 547.
- [27] G. W. A. DICK. *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 559.
- [28] G. W. A. DICK, A. M. BEST, A. J. HADDOW et K. C. SMITHBURN. *Lancet*, 1948, p. 286.
- [29] C. W. JUNGBLUT, M. SANDERS et R. R. FEINER. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 611-629.
- [30] C. W. JUNGBLUT, R. R. FEINER et M. SANDERS. *J. exp. Med.*, 1942, **76**, 31.
- [31] C. W. JUNGBLUT et G. DALLDORF. *Amer. J. publ. Health*, 1943, **33**, 169.
- [32] G. W. A. DICK. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 375.
- [33] J. WARREN, J. E. SMADEL et S. B. RUSS. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 387.
- [34] G. W. A. DICK. Zika virus (sous presse).
- [35] G. W. A. DICK et A. J. HADDOW. Uganda S virus (sous presse).
- [36] MANUEL ROCA GARCIA. *J. infect. Dis.*, 1944, **75**, 160.
- [37] H. W. LAEMMERT et T. P. HUGHES. *J. Immunol.*, 1947, **55**, 61.
- [38] H. KOPROWSKI et T. P. HUGHES. *J. Immunol.*, 1946, **54**, 371.
- [39] F. C. HELWIG et E. C. H. SCHMIDT. *Science*, 1945, **102**, 31.
- [40] J. WARREN et J. E. SMADEL. *J. Bact.*, 1946, **51**, 615.
- [41] J. E. SMADEL et J. WARREN. *J. clin. Investig.*, 1947, **26**, 1197.
- [42] R. S. MUCKENFUS, C. ARMSTRONG et H. A. MAC CORDOCK. *Publ. Health Rep.*, 1933, **48**, 1341.
- [43] L. T. WEBSTER et G. L. FITE. *Science*, 1933, **78**, 463.
- [44] C. TEN BROECK et H. M. MERRILL. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1933, **31**, 217.



- [45] L. T. GILTNER et M. S. SHAHAN. *North. Amer. Veter.*, 1933, **14**, 25-27.
- [46] L. D. FOTHERGILL, J. H. DINGLE, S. FABER et M. L. CONNERLY. *New England J. Med.*, 1938, **219**, 411.
- [47] L. T. WEBSTER et F. H. WRIGHT. *Science*, 1938, **88**, 305.
- [48] K. F. MEYER, C. M. HARING et B. F. HOWITT. *Science*, 1930, **74**, 227.
- [49] B. F. HOWITT. *Science*, 1938, **88**, 455.
- [50] C. M. EKLUND et A. BLUMSTEIN. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1938, **111**, 1734.
- [51] C. E. BECK et R. W. G. WYCKOFF. *Science*, 1938, **88**, 530.
- [52] V. KUBES et F. A. RIOS. *Science*, 1939, **90**, 20.
- [53] J. CASALS, E. C. CURNEN et L. THOMAS. *J. exp. Med.*, 1943, **77**, 521.
- [54] E. H. LENNETTE et H. KOPROWSKI. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1943, **123**, 1088.
- [55] M. HAYASHI. *Proc. Imp. Acad. Jap.*, 1934, **40**, 41.
- [56] S. KASAHARA, M. VEDA, Y. OKAMOTO, S. YOSHIDA, R. HAMANA et R. YAMADA. *Kitasato Arch. exp. Med.*, 1936, **13**, 48.
- [57] R. KAWAMURA, M. KODANA, T. ITO, T. YASAKI, Y. KOBAYAKAWA. *Kitasato Arch. exp. Med.*, 1936, **13**, 281.
- [58] T. TANIGUCHI, M. HOSOKAWA et S. KUYA. *Jap. J. exp. Med.*, 1936, **14**, 185.
- [59] L. A. SILBER et V. D. SOLOVIEV. *Ann. Rev. Soviet. Med.*, supplément spécial, 1946.
- [60] D. G. EDWARD. *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 515.
- [61] W. A. POOL, A. BROWNLEE et D. R. WILSON. *J. comp. Path. Therap.*, 1930, **43**, 253.
- [62] T. M. RIVERS et F. F. SCHWENTKER. *J. exp. Med.*, 1934, **51**, 669.
- [63] CH. ARMSTRONG. *Publ. Health Rep.*, 1939, **54**, 1719.
- [64] CH. ARMSTRONG. *Publ. Health Rep.*, 1939, **54**, 2302.
- [65] C. E. VAN ROOYEN et A. D. MORGAN. *Edinburg Med. J.*, 1943, **50**, 705.
- [66] R. W. SCHLESINGER, I. M. MORGAN et P. K. OLITSKY. *Science*, 1943, **98**, 452.
- [67] MAX THEILER. *Science*, 1934, **80**, 2066.
- [68] MAX THEILER. *J. exp. Med.*, 1937, **69**, 705.
- [69] MAX THEILER et SVEN GARD. *J. exp. Med.*, 1940, **72**, 49.
- [70] CH. ARMSTRONG et R. D. LILLIE. *Publ. Health Rep.*, 1934, **49**, 1019.
- [71] E. TRAUB. *Science*, 1935, **81**, 298.
- [72] T. M. RIVERS et T. F. M. SCOTT. *Science*, 1935, **81**, 439.
- [73] P. LÉPINE, P. MOLLARET et B. KREIS. *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **204**, 1846.
- [74] T. M. RIVERS et T. F. M. SCOTT. *J. exp. Med.*, 1936, **63**, 415.
- [75] T. J. FRANCIS et T. P. MAGILL. *J. exp. Med.*, 1938, **68**, 147.
- [76] M. DURAND, J. NICOLAS et M. FAVRE. *Bull. Soc. Med. Hôp. Paris*, 1913, **35**, 274.
- [77] SVEN HELLERSTRÖM et E. WASSEN. VII<sup>e</sup> Congrès intern. Derm. et Syphiligraphie. Copenhague, 1930.
- [78] C. LEVADITI, P. RAVAUT, P. LÉPINE et M<sup>lle</sup> R. SCHOEN. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 1525.
- [79] C. LEVADITI, P. RAVAUT et M<sup>lle</sup> R. SCHOEN. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 285.

- [80] J. CASALS et R. PALACIOS. *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 409.
- [81] J. CASALS. *J. Immunol.*, 1947, **56**, 337.
- [82] J. CASALS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1942, **49**, 501.
- [83] J. CASALS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **70**, 339.
- [84] J. CASALS, R. O. ANSLOW et G. SELZER. *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **37**, 663.
- [85] J. A. KERR. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 461.
- [86] J. A. KOLMER et F. BOERNER. *Approved Laboratory Technics*. D. Appleton-Century C<sup>ie</sup>, éditeur, Londres, 1945.

# RECHERCHES SUR L'EXISTENCE DE LA FIÈVRE Q EN TUNISIE PAR LA RÉACTION DE DÉVIATION DU COMPLEMENT

par JACQUES MAURIN (\*).

(Institut Pasteur de Tunis.)

La fièvre Q prend actuellement de plus en plus d'importance en Europe. Le colloque OMS/OAA sur les zoonoses qui s'est tenu à Vienne (Autriche) en novembre 1952 en témoigne particulièrement. L'Italie est un des pays où cette affection semble la plus répandue ; de nombreux travaux en ont témoigné.

L'importation d'Italie en Tunisie de moutons dont certains se sont révélés infectés [1] pouvait être la source d'épizooties et secondairement d'épidémies de fièvre Q. Aussi la recherche de cette maladie revêt-elle une importance certaine.

A l'Institut Arloing, des recherches ont été faites sur les animaux domestiques par M<sup>lle</sup> G. Cordier, au moyen d'épreuves allergiques, de réactions sérologiques et d'inoculations au cobaye de laits provenant d'animaux suspects.

A l'Institut Pasteur, du 12 janvier 1952 au 13 mai 1953, nous avons pratiqué des déviations de complément sur des sérums humains, provenant pour la plupart de l'Hôpital Ernest-Conseil (service du D<sup>r</sup> Paul Durand), ainsi que des sérums d'animaux domestiques de différentes régions de Tunisie (ces sérums animaux nous ont, pour la plupart, été remis par le D<sup>r</sup> Renoux).

## RÉACTIFS UTILISÉS.

Antigène. — Soit l'antigène des Laboratoires de la Fièvre des Montagnes Rocheuses, dans l'Etat de Montana (E. U. A.). Titre : 1/32.

Soit l'antigène des Laboratoires Lederle. Plusieurs lots ont été utilisés, 5 de la souche Henzerling et 1 de la souche Nine-Miles. Titres : 1/16.

Tous ces antigènes se sont montrés équivalents.

Complément. — Sérum de cobaye conservé congelé à  $-25^{\circ}$ .

(\*) Manuscrit reçu le 5 août 1953.

Sérum hémolytique concentré de l'Institut Pasteur de Paris.  
Globules rouges de mouton, frais, ou conservés quelques jours dans la solution d'Alsever.

Sérums suspects. — Ils sont inactivés à 56° pendant 30 mn.

#### EXÉCUTION DE LA RÉACTION.

La technique employée est celle de Kolmer modifiée, identique à celle employée dans notre expérience précédente [3]. Cependant, nous avons remplacé plusieurs fois la fixation de 18 h à la glacière par la fixation de 1 h à 37°. Ultérieurement, pour déterminer avec précision la différence entre ces deux techniques, dans les conditions où nous opérons, nous avons réalisé une expérience complémentaire décrite plus loin. Par la même occasion, nous avons comparé les valeurs de différentes températures d'inactivation.

Voici quelle est notre technique exacte.

##### *Titration du complément.*

Distribution du complément aux différentes dilutions et de l'antigène.

Séjour de 1 h au bain-marie à 37°, puis :

Distribution du sérum hémolytique et des globules rouges à 2 p. 100 en culot.

Nouveau séjour de 1 h à 37°.

Le premier tube hémolysé totalement contient une unité de complément.

##### *Réaction.*

Nous en distinguons deux types :

1° *Réaction qualitative*, le sérum suspect étant dilué au 1/16. 2 tubes par sérum, l'un avec antigène, l'autre, témoin, sans antigène. Cette réaction a été faite sur tous les sérums.

2° *Réaction quantitative* à 9 tubes, soit :

6 tubes de réaction, contenant chacun une dilution de sérum suspect, depuis 1/4 jusqu'à 1/128 ;

3 tubes témoins-sérums, contenant chacun une des 3 dilutions de sérum suspect de 1/4, 1/8, 1/16.

Cette réaction quantitative devait être faite en principe sur tous les sérums présentant + + + + à la réaction qualitative ; malheureusement, dans plusieurs cas, la quantité de sérum dont nous avons pu disposer était insuffisante.

Chaque réaction utilise en outre un témoin antigène (AG + C + SH + GR), un témoin du système hémolytique (C + SH + GR) et un témoin des globules rouges (C + GR).

Dans les deux cas, on distribue :



a) L'antigène au taux prescrit (correspondant d'ailleurs à 2 unités) ;

b) 2 unités de complément et l'on met à fixer : soit pendant 1 h à 37°, soit du soir au lendemain matin à la glacière à 4°.

Puis on distribue le sérum hémolytique et les globules rouges et l'on met au bain-marie en surveillant l'hémolyse du témoin antigène et du témoin du système hémolytique. Ces deux tubes hémolisent pratiquement en même temps, généralement en un quart d'heure. On laisse encore les tubes au bain-marie pendant un quart d'heure après l'hémolyse complète du témoin antigène, ceci de manière à faire disparaître les fixations aspécifiques éventuelles. On procède alors à la lecture.

### RÉSULTATS.

Ils sont consignés par catégories dans les tableaux I à IV.

Il convient de remarquer :

1° Que nous ne considérons comme significatifs que les résultats ++ et au-dessus. En effet, les fixations légères (+ et

TABLEAU I. — Sérums caprins.

Date et lieu du prélèvement	Nombre : examiné	Résultats : de : sérums : négatifs :	Résultats : douteux : ± :	Résultats : faiblement : positifs : + :	Résultats : significatifs : ++ :	Résultats : significatifs : +++ :	Résultats : significatifs : ++++ :	Résultats : significatifs : +res. :
29-3-1952- Sidi Tabet	47	27	17		3			
28-5-1952- Djebel Mansour	36	7	17	5	1	1		5
28-5-1952- Pont du Fahs	6		1	2	2	1		
22-8-1952- Abattoir Tunis	18	15	1		1	1		
23-10-1952- Ain Saf-Saf	42	35	1	1	2	1		2
7-11-1952- Oued-el-Abid	59	31	8	6	4	7	2	1
13-11-1952- Oued-el-Abid	129	102	10	9	3	1	3	1
31-1-1953- Saouaf	4	3	1					
26-3-1953- Téboursouk	8	5	1		2			
26-3-1953- Djebel Ahmar	6	6						
13-5-1953- Khledia	62	52	7	3				
Totaux	417	283	64	26	18	12	5	9

(±) sont plus probablement dues à des réactions non spécifiques ;

2° Que la réaction quantitative, quand elle a pu être faite, n'a jamais dépassé le titre de 1/32.

Le tableau V résume les pourcentages obtenus.

### DISCUSSION.

Ces résultats montrent :

Chez l'homme : une absence de + + + + ,



TABLEAU IV. — Sérums humains.

Date et lieu du prélèvement	Nombre de sérums examinés :	Résultats de : entièrement négatifs :	Résultats doutoux ± :	Résultats faiblement positifs + :	Résultats significatifs +++ :	Sérums anticom- plémentaires.
8-2-1952- Hôp. E. Conseil: (Tunis)	3	3				
16-3-1952- Sidi Tabet :	25	23	1	1		
29-3-1952-Hôp. E. Conseil:	3	3				
7-5-1952 "	1	1				
12-6-1952 "	2	2				
22-8-1952 "	1	1				
7-11-1952- Oued-el-Abid:	30	26	2		2	
13-11-1952-	14	14				
21-11-1952-Hôp. E. Conseil:	1	1				
18-12-1952- "	4	4				
2-1-1953- Mébourba :	2	2				
29-1-1953 Hôp. E. Conseil:	2	2				
4-2-1953 "	1	1				
3-3-1953 "	5	5				
20-3-1953-Abattoir Tunis :	9	9				
26-3-1953-Hôp. E. Conseil :	14	10	1	2	1	
26-3-1953-Abattoir Bizerte	20	14	2	2	1	1
26-3-1953-Mébourseuk :	28	10	2	5	2	3
26-3-1953- Djebel Ahmar :	7	7				
13-5-1953- Khledia :	15	14	1			
Totaux	187	152	9	10	4	5

TABLEAU V. — Pourcentage des résultats.

Pourcentage de sérums :	Négatifs :	± :	+	++	+++	anticomplé- mentaires.
Animaux :	64,4 %	11,7 %	5,8 %	3,9 %	2,6 %	4,7 %
Hommes :	81,3 %	4,8 %	5,4 %	2,1 %	2,7 %	0
Total des deux	68,2 %	10,1 %	5,7 %	3,5 %	2,7 %	3,6 %

tués par inoculation au cobaye ou à l'œuf de laits de chèvres présumées infectées ou de broyats de tiques prélevées sur ces animaux, sont restés entièrement négatifs.

EXPÉRIENCE COMPLÉMENTAIRE. — Au sujet des températures d'inactivation et de fixation, ayant eu connaissance d'une note de Davoli et Signorini [2] qui préconisent soit la fixation 1 h à 37° après inactivation à 56°, soit la fixation à froid après inactivation à 62°, nous avons effectué une expérience comparative portant sur des sérums connus qui avaient été conservés à la glacière à +4°.

Le tableau VI donne le détail des résultats. Chaque sérum, inactivé à 56° et à 62° pendant 30 mn, a, dans les deux cas, été examiné avec fixation à 37° et à froid. Pour chaque sérum nous avons donc fait quatre séries de 12 tubes, correspondant à 6 dilu-

TABLEAU VI. — Comparaison des résultats obtenus à différentes températures d'inactivation et de fixation.

Numéro du sérum	Fixation à 37°	Fixation à 37°	Fixation à 4°	Fixation à 4°	
	Inactivation à 56°	Inactivation à 62°	Inactivation à 56°	Inactivation à 62°	
(1)	: 4 4 4 3 T 0 : 4 4 T 0 0 0	: 4 4 3 0 0 0 : T 0 0 0 0 0	: 4 4 4 4 4 2 : 4 4 4 4 3 T	: 4 4 4 4 2 0 : 4 3 2 T 0 0	: : :
(2)	: 4 4 4 4 T 0 : 4 4 1 0 0 0	: 4 4 4 3 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 4 4 1 : 4 4 3 1 0 0	: 4 4 4 4 4 T : 0 0 0 0 0 0	: : :
(3)	: 4 4 1 0 0 0 : 2 0 0 0 0 0	: 1 T 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 3 T 0 : T 0 0 2 0 0	: 4 4 2 T 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(4)	: 4 4 3 T 0 0 : 4 1 0 0 0 0	: 3 2 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 4 2 T : 4 3 0 0 0 0	: 4 4 4 3 T 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(5)	: 2 T 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 0 0 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 T 0 0 0 : T 0 0 0 0 0	: 2 0 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(6)	: 4 3 0 0 0 0 : 4 1 0 0 0 0	: 0 0 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 3 T 0 0 : 4 3 4 1 0 0	: 0 0 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(7)	: - 0 0 0 0 0 : - 0 0 0 0 0	: - 0 0 0 0 0 : - 0 0 0 0 0	: - 1 1 0 0 0 : - 0 0 0 0 0	: - 0 0 0 0 0 : - 0 0 0 0 0	: : :
(8)	: 4 3 1 T 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 3 1 T 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 3 T 0 : 1 2 3 2 T 0	: 4 4 4 2 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(9)	: 3 2 1 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: T 0 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 2 0 0 : 3 2 1 1 1 T	: 4 4 1 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(10)	: 4 3 T 0 0 0 : 2 T 0 0 0 0	: 0 0 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 1 T 0 : 3 2 1 T 0 0	: 4 T 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(11)	: 4 4 4 4 1 0 : 4 4 2 1 T 0	: 4 3 2 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 4 3 T : 4 4 4 3 1 T	: 4 4 4 3 1 0 : 3 1 T 0 0 0	: : :
(12)	: 4 4 3 1 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 3 2 T 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 3 1 0 : T 2 3 1 0 0	: 4 4 4 3 2 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(13)	: 4 4 1 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 3 T 0 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 4 2 1 0 : 0 0 0 0 0 0	: 4 4 2 0 0 0 : 0 0 0 0 0 0	: : :
(14)	: - 0 0 0 0 0 : - 0 0 0 0 0	: - 0 0 0 0 0 : - 0 0 0 0 0	: - 2 1 3 T 0 : - 2 T 0 0 0	: - 3 2 0 0 0 : - 3 2 0 T 0	: : :

tions de sérum, de 1/4 à 1/128, chaque dilution ayant un tube de réaction et un tube témoin-sérum. Suivant la notation habituelle :

- 4 signifie absence complète d'hémolyse ;
- 3 signifie 25 p. 100 d'hémolyse ;
- 2 signifie 50 p. 100 d'hémolyse ;
- 1 signifie 75 p. 100 d'hémolyse ;
- T signifie hémolyse presque complète (traces) ;
- 0 signifie hémolyse complète.



On voit que, conformément à ce qu'ont trouvé les auteurs italiens, l'inactivation à 62° fait disparaître une grande partie du pouvoir anticomplémentaire des sérums.

Sur ces sérums inactivés à 62°, la fixation à chaud ne donne pas de bons résultats : elle diminue fortement le titre. La fixation à froid, au contraire, donne des résultats au moins aussi bons que la fixation à chaud sur les sérums inactivés à 56°. Ceci confirme les résultats italiens.

Sur les sérums inactivés à 56°, la fixation à chaud donne donc d'assez bons résultats. La fixation à froid, de son côté, fait apparaître quelques résultats aberrants difficiles à expliquer (8<sup>e</sup> sérum, tubes témoins ; 12<sup>e</sup> sérum, tubes témoins ; 14<sup>e</sup> sérum, tubes de réaction).

Il semble donc qu'on doive préférer l'une des deux techniques suivantes :

Inactivation à 56°, suivie de fixation à 37° ;

Inactivation à une température plus élevée (62°), suivie de fixation à la glacière.

#### CONCLUSION.

A part un troupeau importé de Sardaigne, où l'on a trouvé des résultats fortement positifs [1], il ne semble pas y avoir actuellement en Tunisie de foyers de fièvre Q, ni chez l'animal ni chez l'homme. On a affaire à une enzootie plutôt qu'à une épizootie. En particulier, nous n'avons pas trouvé de résultats intéressants chez les ouvriers des abattoirs, qui peuvent être, comme c'est le cas en Italie, de véritables réactifs d'une infection dans les troupeaux.

#### RÉSUMÉ.

Les résultats des réactions de déviation du complément effectuées à l'Institut Pasteur de Tunis ne sont pas en faveur d'épidémies, ni même d'épizooties de fièvre Q en Tunisie.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M<sup>lle</sup> G. CORDIER, C. KOVALENKO et B. HAROUNI. *Rec. Méd. vétér. Alfort*, 1953, **129**, 565.
- [2] R. DAVOLI et L. F. SIGNORINI. *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1951, **30**, 93.
- [3] J. MAURIN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 649.

## RÉACTIONS D'HÉMAGGLUTINATION ET D'HÉMOLYSE CONDITIONNÉE DANS LA LÈPRE

par M. VIETTE (\*).

(Institut Pasteur. Service de la Lèpre.)

Depuis que les réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée ont été appliquées à la tuberculose, il a été constaté qu'elles pouvaient être également utilisées, avec un antigène extrait du bacille de Koch, dans différentes affections à bacilles acido-résistants, et en particulier dans la maladie de Hansen. Gernez-Rieux, Monestruuc et Tacquet d'une part, avec les deux réactions, et Lévine d'autre part, avec l'hémagglutination, ont montré que l'on obtenait chez certains lépreux indemnes de tuberculose des taux d'anticorps plus élevés que chez les tuberculeux. Nous avons pensé intéressant d'étudier les relations entre les taux d'anticorps et l'état clinique du malade. Les deux réactions ont été effectuées sur le sérum de 100 lépreux.

### TECHNIQUE.

L'antigène utilisé est la fraction polyosidique St de la tuberculine I P 48, préparée par A. Lamensans, P. Grabar et J. Bretey [5] délivrée par l'Institut Pasteur (antigène pour la réaction d'hémagglutination dans la tuberculose). Son support est une suspension d'hématies de mouton que l'on dilue, après adsorption de l'antigène, à 0,5 p. 100.

Le sérum à étudier est dilué au 1/2 dans du sérum physiologique, inactivé par chauffage à 56° pendant trente minutes et saturé à deux reprises par des hématies de mouton non sensibilisées.

*Réaction d'hémagglutination :* Des dilutions croissantes de sérum sont mises en contact, à 37° pendant deux heures, avec un volume égal (0,4 cm<sup>3</sup>) de la suspension d'hématies sensibilisées. Une lecture provisoire peut être faite immédiatement, mais la lecture définitive est effectuée le lendemain. Tous les résultats que nous rapportons ont été obtenus par cette méthode. Mais des essais ont été pratiqués pour obtenir une réponse plus rapide : Lévine [6] signale avoir obtenu de bons résultats en agitant les tubes sur l'appareil de Kahn pendant quinze minutes et en centrifugeant. La lecture se fait immédiatement. Senault place les tubes au bain-marie à 37° pendant quinze minutes

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 1<sup>er</sup> octobre 1953.

et centrifuge à faible vitesse pendant cinq minutes. La lecture immédiate donne le même résultat que la lecture après vingt-quatre heures dans la technique classique [40]. Nous avons essayé une autre variante. Les portoirs sont laissés à la température du laboratoire pendant trente minutes. A trois reprises, au cours de cet intervalle, les portoirs sont agités à la main pendant quelques secondes. Une centrifugation de cinq minutes à faible vitesse permet la lecture immédiate. Cette méthode, utilisée pour 25 sérums, nous a donné les mêmes résultats que la technique classique.

*Hémolyse conditionnée* : Les dilutions de sérum et la suspension d'hématies sensibilisées sont mises en contact comme pour la réaction d'héماغglutination, mais on ajoute dans chaque tube 0,05 cm<sup>3</sup> d'alexine diluée au 1/3, saturée à deux reprises à + 4° par les globules de mouton, et titrée. On porte à 37° pendant une heure et on lit immédiatement. D'après Middlebrook, étudiant des sérums de tuberculeux, la quantité d'alexine nécessaire est le triple de la dose nécessaire pour obtenir la lyse des globules de mouton en présence d'un excès de sérum hémolytique anti-mouton [9]. En pratique, nous utilisons toujours le complément dilué seulement au 1/3. Une dilution plus grande est apparue insuffisante, même lorsque le titrage préalable, en présence de sérum hémolytique, montre le complément très actif.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — Gernez-Rieux, Montestruc et Tacquet obtiennent, avec la fraction polysidique, chez 55 lépromateux des taux maxima pour l'héماغglutination de 1/4 096 (taux moyen 1/557) et pour l'hémolyse conditionnée de 1/16 384 (taux moyen 1/671). Chez 23 tuberculoïdes et indéterminés, les chiffres sont de 1/128 (taux moyen 1/35) pour l'héماغglutination et de 1/64 (taux moyen 1/4) pour l'hémolyse [4].

Levine et ses collaborateurs, observant 321 lépreux, constatent que le taux moyen d'héماغglutination est plus élevé chez les lépreux que chez les tuberculeux (109 cas) et plus élevé chez ceux-ci que chez les sujets sains (75 donneurs de sang). Parmi les lépreux, les taux moyens sont, par ordre décroissant, les suivants : lépromateux, indéterminés et tuberculoïdes. Ces mêmes auteurs observent que le taux d'héماغglutination est également décroissant, indépendamment du type de la maladie, suivant l'état du sujet : maladie active, quiescente, en régression, malade blanchi [7].

Candido Silva et Laerte de Andrade [12] constatent également des taux plus élevés d'héماغglutination chez les lépromateux que chez les tuberculoïdes et indéterminés, ces deux dernières catégories de malades donnant des résultats assez proches. D'autre part, chez les lépromateux, ces auteurs, étudiant séparément les malades présentant ou non des « érythèmes noueux », observent que les taux d'héماغglutination sont plus bas chez les malades présentant des « érythèmes noueux ». Ils y trouvent une confirmation de l'opinion des cliniciens, suivant laquelle

l'apparition d' « érythème noueux » est d'un pronostic favorable.

Marco Ahuir, Torella Gil et Alcazar Garcia constatent également un taux d'hémagglutination plus élevé chez les lépromateux que chez les indéterminés. Chez 6 tuberculoïdes étudiés par eux, la réaction a été négative. Parmi les lépromateux le taux est plus élevé chez les sujets non traités en évolution que chez les malades en régression spontanée ou sous l'influence du traitement. Ces auteurs observent les taux les plus élevés chez les lépromateux, sujets à des états de « réaction » [8].

Floch et Sohier pratiquent la réaction d'hémagglutination avec une technique modifiée : 0,05 cm<sup>3</sup> de suspension à 1/80 d'hématies sensibilisées pour 0,3 cm<sup>3</sup> de dilution de sérum. La réaction est considérée comme positive lorsque le taux d'hémagglutination est supérieur à 1/8. Ces auteurs obtiennent une réaction positive chez 20 lépromateux sur 31 (64,5 p. 100), chez 7 tuberculoïdes sur 27 (25,9 p. 100) et chez 8 indéterminés sur 35 (22,8 p. 100). Toutefois les taux maxima obtenus ne sont pas précisés.

Basset, Boujnah et Cassius de Linval [4], pratiquant la réaction d'hémagglutination chez 18 lépreux, observent les taux les plus élevés chez les lépromateux (jusqu'à 1/512). Les taux les plus faibles sont constatés dans la lèpre tuberculoïde et dans les formes non évolutives. Chez une malade traitée, le taux est passé en quatre mois de 1/128 à 1/32.

**RÉSULTATS PERSONNELS.** — Parmi 56 lépromateux, 13 indéterminés et 31 tuberculoïdes, les taux d'hémagglutination que nous obtenons s'échelonnent respectivement de 1/4 à 1/4 096 (taux moyen 1/227), 1/4 à 1/128 (taux moyen 1/39) et 0 à 1/64 (taux moyen 1/15).

Les taux d'hémolyse pour les mêmes groupes vont de 0 à 1/512 (taux moyen 1/49), 0 à 1/128 (taux moyen 1/16) et 0 à 1/64 (taux moyen 1/16).

Un malade « Borderline » présente 1/64 à l'hémagglutination et 1/4 à l'hémolyse. On constate que l'hémagglutination et l'hémolyse chez les lépromateux atteignent des taux beaucoup plus élevés que chez les tuberculoïdes et indéterminés. Par contre, la moyenne dans ces deux derniers groupes est très voisine pour l'hémagglutination et identique pour l'hémolyse.

Si on examine, à l'intérieur de chaque groupe, la répartition des malades le long des courbes, on constate que le taux d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée, pour chaque sujet, est d'autant plus faible que la maladie de celui-ci est en régression. C'est ainsi que chez les lépromateux un taux d'hémagglutination inférieur à 1/64 correspond en général à un nombre peu abondant de bacilles sur les frottis de lésions cutanées, les globies sont plus ou moins vidées et les bacilles en majorité granuleux.



TABLEAU I. — Taux d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée suivant la forme clinique.

Taux d'anticorps	Hémagglutination			Hémolyse conditionnée		
	Lépromateux 56	Indéterminé 13	Tuberculoïde 31	Lépromateux 54	Indéterminé 12	Tuberculoïde 30
0			1	19	6	11
1/2			4	1	1	2
1/4	2	2	-	3	2	4 (dont 1 TB(*))
1/8	1	2	6	7	-	4
1/16	8	2	15	8	1	3
1/32	9	4	4	3	1	2
1/64	16	2	1 (TB)	7	-	4
1/128	8	1	-	1	1	-
1/256	6	-	-	3		
1/512	3	-	-	2		
1/1024	1					
1/2048	1					
1/4096	1					
Moyenne	1/227	1/39	1/15	1/49	1/16	1/16

(\*) Lèpre « Borderline ».

TABLEAU II. — Taux d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée suivant l'évolution.

Forme évolutive		Hémagglutination	Hémolyse
L	{ forme aiguë	1/32 à 1/4096	0 à 1/512
	{ forme quiescente	1/32 à 1/512	0 à 1/512
	{ forme régressive	1/4 à 1/256	0 à 1/64
I	{ forme quiescente	1/4 à 1/32	0 à 1/128
	{ forme régressive	1/4 à 1/128	0 à 1/32
T	{ forme aiguë	1/16 à 1/32	0 à 1/64
	{ forme quiescente	1/8 à 1/32	0 à 1/64
	{ forme régressive	0 à 1/16	0 à 1/64

Cependant, nous voyons (tableau II) que, dans chaque forme de la maladie, certains malades régressifs ont des taux d'hémagglutination et d'hémolyse plus élevés que des malades en évolution.

Des réactions d'hémagglutination répétées entre six et dix mois après la première, chez 20 malades, ont montré dans 9 cas une diminution du taux de celle-ci, qui correspondait à une amélioration clinique. Toutefois, dans 3 cas, il a été noté une légère augmentation du taux d'hémagglutination qui ne correspondait pas à une aggravation de l'état clinique. Cette réaction permettrait

alors de suivre l'évolution de la maladie ainsi que l'ont signalé Gernez-Rieux, Montestruc et Tacquet.

Ces auteurs ont remarqué que le pourcentage des sérums présentant une réaction d'hémolyse conditionnée supérieure à 1/8 était plus faible chez les lépreux que chez les tuberculeux. Ils ont étudié une modification de la technique d'hémolyse conditionnée : elle consiste, après incubation d'une heure à 37°, sans complément, à centrifuger les globules sensibilisés en contact avec le sérum à étudier, les laver à l'eau physiologique, puis les remettre en suspension dans l'eau physiologique, et les placer à nouveau à 37° en présence de complément. Le sérum de malade qui n'a pas été adsorbé par les globules sensibilisés pendant la première incubation est donc rejeté. Cette méthode leur a donné des taux d'hémolyse plus élevés que par la méthode classique. Ces auteurs estiment, d'après ce résultat, que l'hémolyse est inhibée par l'excès de sérum lépreux. Il est, en effet, classique que le sérum de lépreux est souvent anti-complémentaire et ceci de façon marquée. Ainsi Shively et Kuhns, étudiant les réactions de déviation du complément de la syphilis chez 142 lépreux, ont dû en rejeter 24 en raison de leur activité anti-complémentaire [41]. Nous avons essayé la méthode préconisée par Gernez-Rieux, Montestruc et Tacquet, mais les résultats n'ont pas été identiques : au contraire, les taux d'hémolyse obtenus ainsi étaient plus faibles que par la méthode de Middlebrook.

La pratique de la réaction d'hémolyse conditionnée chez les lépreux est donc entravée par cette particularité de leur sérum. Toutefois, cette réaction n'est pas sans intérêt. On constate, en effet, parmi des malades présentant le même taux d'hémagglutination, que l'hémolyse est plus faible chez le sujet dont les lésions sont moins bacillifères. D'autre part, 4 malades non traités présentent une réaction d'hémolyse relativement élevée par rapport à la réaction d'hémagglutination et parfois supérieure à celle-ci. La réaction d'hémolyse nous paraît donc s'abaisser plus rapidement, chez le malade traité, que la réaction d'hémagglutination. Elle pourrait alors renseigner plus rapidement sur l'amélioration du sujet.

Si on groupe les malades, non suivant la classification clinique, mais suivant l'intensité de la réaction de Mitsuda, on observe que les taux d'hémagglutination et d'hémolyse sont d'autant plus faibles que la réaction de Mitsuda est fortement positive.

Les taux maxima pour l'hémagglutination sont respectivement : 1/16 (Mitsuda + + +), 1/32 (Mitsuda + +), 1/64 (Mitsuda +) et 1/4 096 (Mitsuda négatif), avec des taux moyens de 1/10,1, 1/14,9, 1/22,8, 1/216,6. Pour l'hémolyse, les taux maxima sont : 1/64 (+ + +), 1/64 (+ +), 1/128 (+), 1/512 (Mitsuda négatif), les taux moyens étant : 1/7,6, 1/12,5, 1/26,8, 1/46,4.

Certains auteurs estiment que les réactions d'hémagglutination

TABLEAU III. — Taux d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée suivant la réaction à la lépromine.

Taux d'anticorps	Réaction à la lépromine +++		Réaction à la lépromine ++		Réaction à la lépromine +		Réaction à la lépromine -	
	Hémaggl.	Hémolyse	Hémaggl.	Hémolyse	Hémaggl.	Hémolyse	Hémaggl.	Hémolyse
0		8	1	4		3		19
1/2	3		1	1		2		2
1/4	1	1		1		1	3	6
1/8	2	1	4	2	2	2	1	6
1/16	6	1	4	2	7	1	7	8
1/32			3	1	4	2	10	3
1/64		1		1	1	2	18	7
1/128						1	9	1
1/256							6	3
1/512							3	2
1/1024							1	
1/2048							1	
1/4096							1	
<u>Novenne</u>	<u>1/10,1</u>	<u>1/7,6</u>	<u>1/14,9</u>	<u>1/12,5</u>	<u>1/22,8</u>	<u>1/26,8</u>	<u>1/216,6</u>	<u>1/46,4</u>

et d'hémolyse conditionnée peuvent faciliter le diagnostic de maladie de Hansen et le classement des malades. Nous ne sommes pas de cet avis.

On doit remarquer que l'antigène utilisé n'est pas spécifique, puisqu'il est préparé à partir des bacilles de Koch et donne des résultats dans la tuberculose. Pour cette raison, il paraît arbitraire de choisir un taux au-dessous duquel la réaction est considérée dans la lèpre comme négative. Si ces réactions, pratiquées chez un sujet suspect de lèpre, donnent un résultat inférieur ou égal à 1/32, le diagnostic ne peut être tranché puisque des sujets sains, utilisés comme donneurs de sang, présentent parfois, rarement il est vrai, les mêmes taux. Et lorsque les taux atteignent ou dépassent 1/64, il s'agit le plus souvent, mais non toujours, de lépromateux. Or, le diagnostic de lèpre lépromateuse est fait, en général, aisément par les examens clinique et bactériologique.

De même, on ne peut attendre une contribution importante des réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée pour le classement d'un malade. En effet, nous avons vu que certains tuberculoïdes et indéterminés, à lésions actives, présentent des taux plus élevés que des lépromateux régressifs. Il est donc impossible, en se fondant sur ces réactions, d'établir un diagnostic différentiel entre les formes de la lèpre.

Le fait que les taux d'hémagglutination et d'hémolyse des formes tuberculoïde et indéterminée sont très proches est un nouvel argument à l'appui de la classification qui les groupe sous le nom de lèpre bénigne, opposée à la lèpre maligne, lépromateuse, ainsi que l'a proposé R. Chaussinand [2].

Nous avons vu que les taux obtenus n'ont pas une valeur absolue lorsqu'ils sont considérés isolément. Ce qui importe, c'est la variation de ces chiffres chez chaque malade. A notre avis, le seul intérêt de ces deux réactions réside dans la possibilité de contrôler l'évolution d'un malade en les répétant périodiquement. On aurait ainsi, pour chaque sujet, une courbe qui dans une évolution favorable devrait décroître sous l'influence du traitement. La persistance de taux élevés chez un sujet présentant une amélioration clinique et bactériologique devrait faire craindre l'apparition d'une nouvelle poussée.

#### CONCLUSION.

La réaction d'hémagglutination pratiquée chez 100 lépreux a donné des taux variant de 1/4 à 1/4 096 chez 56 lépromateux, 1/4 à 1/128 chez 13 indéterminés et 0 à 1/64 chez 31 tuberculoïdes (taux moyens : 1/227, 1/39, 1/15). La réaction d'hémolyse conditionnée, chez 96 malades, a donné : 0 à 1/512 chez 54 lépromateux, 0 à 1/128 chez 12 indéterminés et 0 à 1/64 chez 30 tuberculoïdes (taux moyens : 1/49, 1/16, 1/16).

On constate, ainsi que cela a déjà été signalé, que les chiffres obtenus sont plus élevés chez les lépromateux que chez les indéterminés, et plus élevés chez ceux-ci que chez les tuberculoïdes. A l'intérieur de chaque groupe les taux sont d'autant plus élevés que la maladie est plus active.

Si on classe les malades, non d'après leur forme clinique, mais suivant l'intensité de la réaction de Mitsuda, on observe que les taux d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée sont d'autant plus élevés que la réaction de Mitsuda est plus faible.

Nous ne pensons pas que ces réactions puissent apporter un appoint sérieux pour le diagnostic de la lèpre, ni pour le classement des malades. La diminution, dans certains cas, des taux obtenus, après six à dix mois, au cours du traitement sulfoné, diminution accompagnant une amélioration clinique, permet de penser que le véritable intérêt des réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée serait, en les répétant régulièrement, de contrôler l'évolution de la maladie.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BASSET, A. BOUJNAH et CASSIUS DE LINVAL. *Bull. Soc. Franç. Dermat. Syphil.*, 1953, n° 1, 38.
- [2] R. CHAUSSINAND. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, 46, 252.
- [3] H. FLOCH et R. SOHIER. *Soc. Path. exot.*, séance du 10 juin 1953.
- [4] Ch. GERNEZ-RIEUX, E. MONTESTRUC et A. TACQUET. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, 136, 375.



- [5] A. LAMENSANS, P. GRABAR et J. BRETEY. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1967.
- [6] M. LEVINE. *Int. J. Leprosy*, 1951, **19**, 199.
- [7] M. LEVINE, E. K., CHUNG-HOON, E. ICHIRIU, F. ARAKAKI et M. BEATTY. *Int. J. Leprosy*, 1952, **20**, 201.
- [8] MARCO AHUIR, TORELLA GIL et ALCAZAR GARCIA. *Fontilles*, 1952, 105.
- [9] Ch. MIDDLEBROOK. *J. Clin. Investig.*, 1950, **29**, 1480.
- [10] P. SENAULT. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 750.
- [11] J. A. SHIVELY et D. M. KUHS. *Int. J. Leprosy*, 1950, **38**, 169.
- [12] C. SILVA et L. DE ANDRADE. *Arquivos Serviço Nacional de Lepra Rio-de-Janeiro*, 1952, **10**, 27.

**ÉTUDE DE L'ACTION DU BCG  
SUR LA FORMULE LEUCOCYTAIRE  
ET LA PHAGOCYTOSE  
DANS L'EXSUDAT PÉRITONÉAL DE COBAYES  
INOCULÉS AVEC DES BACILLES DE STEFANSKY  
VIVANTS OU MORTS**

par J. NEYRA-RAMIREZ (\*).

*(Institut Pasteur. Service de la Lèpre.)*

Nous avons recherché si la vaccination par le BCG pouvait renforcer la résistance naturelle du cobaye à l'infection provoquée par le bacille de Stefansky. Dans ce dessein, nous avons étudié les variations de la formule leucocytaire et la phagocytose dans l'exsudat péritonéal de cobayes neufs et de cobayes vaccinés par le BCG, inoculés par voie intrapéritonéale avec des bacilles de Stefansky vivants ou morts.

Cette expérience a été effectuée de la manière suivante :

Cinq cobayes de même poids ont été vaccinés au BCG par voie intradermique à la dose de 0,10 mg. Tous ont présenté localement un nodule vaccinal et ont réagi fortement à la tuberculine après 6 semaines (Mantoux : 10 mg de tuberculine I. P. 48 à 50 unités). Ensuite, 3 cobayes vaccinés et 3 témoins de poids égal ont été inoculés par voie intrapéritonéale avec respectivement 1 cm<sup>3</sup>, 1,5 cm<sup>3</sup> et 2 cm<sup>3</sup> d'une suspension très riche en bacilles de Stefansky vivants. D'autre part, 2 cobayes vaccinés et 2 témoins ont reçu 2 cm<sup>3</sup> de la même suspension bacillaire, mais préalablement autoclavée à 115° pendant 1 heure.

L'exsudat péritonéal a été recueilli en employant la technique mise au point par Metalnikov et Toumanoff [4]. Les prélèvements ont été pratiqués 1 h. 30, 4 heures, 7 heures, 24 heures et 48 heures après l'inoculation, puis tous les 2 jours jusqu'au 21<sup>e</sup> jour et enfin les 30<sup>e</sup>, 35<sup>e</sup>, 40<sup>e</sup>, 50<sup>e</sup>, 75<sup>e</sup> et 100<sup>e</sup> jours.

Les résultats notés dans chacun des quatre groupes d'animaux

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1<sup>er</sup> octobre 1953.

en expérience s'étant révélés sensiblement identiques, nous rapporterons nos observations dans le texte et nous ne présenterons, à titre d'exemple, qu'un tableau pour chaque groupe.

### I. — Cobayes non vaccinés par le BCG.

1° INOCULATION DE 1 CM<sup>3</sup>, 1,5 CM<sup>3</sup> ET 2 CM<sup>3</sup>  
D'UNE SUSPENSION DE BACILLES DE STEFANSKY VIVANTS.

a) *Réaction cellulaire.* — On observe une réponse leucocytaire rapide. 1 h. 30 après l'inoculation, on constate déjà une forte polynucléose (75 à 86 p. 100). Cette polynucléose, qui peut atteindre la proportion de 96 p. 100 à la 4<sup>e</sup> heure, décroît progressivement après 24 heures. Mais on note ultérieurement de légères poussées irrégulières de polynucléose. A partir du 2<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour, ce sont les monocytes qui prédominent. Ils atteignent leur maximum entre 2 et 6 jours. Ensuite, le nombre des lymphocytes

TABLEAU 1. — Cobaye n° 3, non vacciné. 2 cm<sup>3</sup> de B. S. vivants.

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h. 30	<u>86</u>	9	5	<u>49</u>	6	2	+++
4 h.	80	15	15	30	1	-	++
7 h.	70	27	3	21	5	1	+
24 h.	61	37	2	16	12	2	+
2 jours	22	<u>67</u>	11	4	<u>49</u>	<u>4</u>	
4 "	19	63	14	2	29	2	
6 "	10	43	47	2	20	1	
8 "	8	35	57	0	22	2	
10 "	15	32	53	1	17		
12 "	5	30	65		20	1	
14 "	6	26	68		10		
16 "	6	31	63		4		
18 "	11	20	69		2		
20 "	8	10	82				
22 "	6	18	76				
25 "	2	8	<u>90</u>				
27 "	2	23	75				
30 "	3	11	86				
50 "	3	35	62				
75 "	12	22	66				
100 "	8	55	37				

augmente et arrive, entre le 20<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour, à des pourcentages variant de 80 à 92. Vers le 100<sup>e</sup> jour, on observe à nouveau une légère mononucléose. La réaction cellulaire est donc du type mono-lymphocytaire.

b) *Phagocytose*. — La phagocytose débute par les polynucléaires et atteint pendant les premières heures un index phagocytaire de 49 à 59. Mais, après 24 à 48 heures, c'est la phagocytose par les monocytes qui domine (maximum : 49 p. 100). Elle a été observée en dernier lieu entre le 16<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour.

c) *Autophagie leucocytaire*. — L'autophagie [2], c'est-à-dire la destruction des phagocytes par d'autres phagocytes, est faible. Elle est exercée par les monocytes qui s'attaquent en premier lieu aux polynucléaires, contenant ou non des bacilles, puis uniquement aux monocytes. L'autophagie constatée pendant 12 à 16 jours parvient à son maximum (3 à 6 p. 100) entre 24 et 48 heures.

d) *Bacilles libres*. — Les bacilles libres disparaissent de l'exsudat après 24 à 48 heures. Leur nombre semble être en rapport avec la dose de germes inoculés.

e) *Altération des noyaux des polynucléaires*. — Pendant les premières heures de l'expérience, on remarque la dégénérescence pycnotique des noyaux des polynucléaires.

#### 2<sup>e</sup> INOCULATION DE 2 CM<sup>3</sup>

##### D'UNE SUSPENSION DE BACILLES DE STEFANSKY MORTS.

a) *Réaction cellulaire*. — La réaction cellulaire est semblable à celle due à l'inoculation de bacilles vivants : polynucléose, suivie, à partir du 2<sup>e</sup> au 4<sup>e</sup> jour, par une réaction mono-lymphocytaire.

b) *Phagocytose*. — La durée de la phagocytose, exercée d'abord par les polynucléaires, puis par les monocytes, s'est montrée plus courte (10 à 14 jours) qu'après l'inoculation de bacilles vivants (16 à 20 jours). L'intensité de la phagocytose a été plus faible que dans l'expérience précédente. Les pourcentages les plus élevés étaient : 30 pour les polynucléaires et 15 pour les monocytes.

c) *Autophagie leucocytaire*. — L'autophagie s'est révélée faible (maximum : 2 à 3 p. 100) et n'a plus été observée après 12 à 14 jours.

d) *Bacilles libres*. — Les bacilles libres disparaissent après 24 à 48 heures, comme dans l'expérience à bacilles vivants.

e) *Altérations des noyaux des polynucléaires*. — Contrairement à l'expérience précédente, on ne constate pas de pycnose des noyaux des polynucléaires.



TABLEAU II. — Cobaye n° 4, non vacciné. 2 cm<sup>3</sup> de B.S. morts.

Temps							Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h.30	73	9	18	13	1	1	+++
4 h.	86	4	10	<u>14</u>	2	1	+++
7 h.	<u>90</u>	8	2	5	1	1	+
24 h.	79	16	5	6	2		
2 jours	24	<u>55</u>	11	2	<u>15</u>	<u>2</u>	+
4 "	21	49	30	2	4	1	
6 "	50	28	22	-	5	1	
8 "	22	38	40	-	3		
10 "	19	30	51	-			
12 "	11	33	56	-	1	1	
14 "	10	23	67	-	1	1	
16 "	10	25	61				
18 "	5	24	71				
20 "	2	23	75				
22 "	-	-	-				
25 "	2	18	80				
30 "	5	17	78				
50 "	2	11	87				
75 "	2	10	<u>88</u>				
100 "	5	20	75				

## II. — Cobayes vaccinés par le BCG.

1° INOCULATION DE 1 CM<sup>3</sup>, 1,5 CM<sup>3</sup> ET 2 CM<sup>3</sup>  
D'UNE SUSPENSION DE BACILLES DE STEFANSKY VIVANTS.

a) *Réaction cellulaire.* — Cette réaction est pratiquement identique à celle des cobayes non vaccinés : polynucléose suivie de mono-lymphocytose.

b) *Phagocytose.* — La durée de la phagocytose a été de 12 à 14 jours, c'est-à-dire plus courte que chez les cobayes non vaccinés inoculés avec des bacilles vivants (16 à 20 jours) et sensiblement égale à celle des animaux non vaccinés inoculés avec des bacilles morts (10 à 14 jours). Les pourcentages les plus élevés étaient : 68 pour les polynucléaires et 25 pour les monocytes.

c) *Autophagie leucocytaire.* — L'autophagie exercée par les monocytes (maximum : 3 à 6 p. 100) s'est arrêtée après 4 à 8 jours, tandis qu'elle pouvait être encore notée chez les animaux non vaccinés les 12<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> jours.

TABLEAU III. — Cobaye n° 7, vacciné au BCG. 2 cm<sup>3</sup> de B.S. vivants.

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h.30	75	8	17	62	3	2	+ + + +
4 h.	<u>90</u>	2	8	40	2	2	+ +
7 h.	80	18	2	20	6	2	+
24 h.	61	39	0	40	<u>25</u>	<u>2</u>	+
2 jours	60	25	15	5	12	1	
4 "	21	<u>41</u>	38	2	10	1	
6 "	4	30	66	-	7		
8 "	12	23	65	-	6		
10 "	6	26	74	-	6		
12 "	3	23	<u>74</u>	-	2		
14 "	2	23	75	-	2		
16 "	1	22	77				
18 "	2	25	73				
20 "	1	21	<u>78</u>		1		
22 "	2	28	70				
25 "	1	35	64				
30 "	1	50	49				
50 "	-	58	42				
75 "	-	45	55				
100 "	1	44	55				

d) *Bacilles libres.* — Les bacilles libres ont disparu de l'exsudat dans les mêmes délais que chez les cobayes non vaccinés.

e) *Altérations des noyaux des polynucléaires.* — La pycnose des noyaux des polynucléaires a été observée pendant les premières heures de l'expérience, comme chez les cobayes non vaccinés inoculés avec des bacilles vivants.

## 2° INOCULATION DE 2 CM<sup>3</sup>

### D'UNE SUSPENSION DE BACILLES DE STEFANSKY MORTS.

a) *Réaction cellulaire.* — La réaction cellulaire est analogue à celles observées dans les trois expériences précédentes.

b) *Phagocytose.* — La durée de la phagocytose s'est montrée un peu plus longue (14 à 18 jours) que celle notée chez les cobayes vaccinés inoculés avec des bacilles vivants (12 à 14 jours). Les pourcentages les plus élevés étaient : 25 pour les polynucléaires et 12 pour les monocytes.

c) *Autophagie leucocytaire.* — L'autophagie (maximum :

TABLEAU IV. — Cobaye n° 10, vacciné au BCG. 2 cm<sup>3</sup> de B.S. morts.

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h.30	65	7	28	20	3	1	+++
4 h.	96	1	3	23	1	2	++
7 h.	85	3	12	25	10	2	++
24 h.	70	25	5	22	12	3	+
2 jours	55	45	5	10	12	2	+
4 "	7	70	23	1	5	2	
6 "	10	42	48		3	1	
8 "	15	30	55		2		
10 "	10	22	68		3		
12 "	9	27	64				
14 "	4	16	80				
16 "	5	15	80		4		
18 "	4	21	75		1		
20 "	2	18	80				
22 "	1	22	77				
25 "	2	28	70				
30 "	1	39	60				
50 "	0	51	49				
75 "	1	60	39				
100 "	2	59	39				

3 p. 100) n'a été observée que pendant les 4 à 6 premiers jours, c'est-à-dire pendant une durée sensiblement égale à celle constatée chez les cobayes vaccinés inoculés avec des bacilles vivants (4 à 8 jours). On note, au contraire, une différence marquée avec les chiffres obtenus chez les animaux non vaccinés, inoculés avec des bacilles vivants (12 à 16 jours) ou avec des bacilles morts (12 à 14 jours).

d) *Bacilles libres*. — Les bacilles libres disparaissent de l'exsudat après 48 heures.

e) *Altérations des noyaux des polynucléaires*. — On ne note pas de pycnose des noyaux des polynucléaires.

### Conclusions.

La recherche d'une action éventuelle de la vaccination préventive par le BCG sur des cobayes inoculés par voie intrapéritonéale avec des bacilles de Stefansky vivants ou morts a été effectuée en étudiant dans l'exsudat péritonéal, pendant 100 jours, la

réaction cellulaire, la phagocytose, l'autophagie leucocytaire, la durée de la présence de bacilles libres et les altérations des noyaux des polynucléaires.

Les différences notées chez les cobayes vaccinés et non vaccinés peuvent paraître peu importantes. Mais il faut tenir compte du fait que le cobaye présente une résistance naturelle à l'infection provoquée par le bacille de Stefansky. On observe néanmoins que l'autophagie leucocytaire, c'est-à-dire la destruction par les monocytes, d'abord des polynucléaires contenant ou non des bacilles, puis des monocytes en état de phagocytose, se révèle d'une durée nettement plus courte chez les animaux vaccinés (4 à 8 jours pour les inoculations à bacilles vivants ; 4 à 6 jours pour les inoculations à bacilles morts) que chez les non-vaccinés (12 à 16 jours pour les inoculations à bacilles vivants ; 12 à 14 jours pour les inoculations à bacilles morts). L'autophagie leucocytaire pouvant être considérée comme un phénomène de défense de l'organisme complémentaire de la phagocytose, on peut interpréter la durée plus courte de l'autophagie chez les animaux vaccinés comme un indice de l'action du BCG. La vaccination préalable par le BCG déterminerait une stimulation spéciale des monocytes entraînant une destruction plus rapide des bacilles de Stefansky injectés.

La pycnose des noyaux des polynucléaires constatée uniquement chez les cobayes inoculés avec des bacilles vivants pourrait être due à une action toxique, soit des bacilles de Stefansky vivants, soit du tissu murin vivant, action qui serait détruite par l'autoclavage.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. METALNIKOV et C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1925, **39**, 22 et 909.
- [2] C. TOUMANOFF. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **93**, 1281.



# ANTICORPS BLOQUANT DANS LE SÉRUM DE SUJETS BRUCELLIQUES

## IV. — RÔLE DANS LE PHÉNOMÈNE DE ZONE

(DEUXIÈME NOTE)

par G. RENOUX (\*)

(Institut Pasteur, Tunis.)

L'existence d'un anticorps bloquant spécifiquement *Brucella* dans certains sérums humains ou animaux ne fait plus de doute. Pressenti par Taylor, Lisbonne, Vidal et Hazemann [1], ce fait est établi par divers travaux : ceux de Griffiths [2], Cox et Kuttner [3], Renoux [4 a et b], Carrère et Renoux [5], Wilson et Merrifield [6], Schuhardt et coll. [7], Jones et Wilson [8], Hall et Manion [9] par exemple. Ces publications faisant appel aux deux méthodes possibles : blocage de l'agglutination par un sérum sûrement agglutinant ajouté à la suspension microbienne traitée par le sérum suspect, ou agglutination d'une telle suspension par un sérum antiglobuline, ont établi la spécificité de l'anticorps bloquant et sa thermolabilité.

Elles nous permettent de reprendre et d'étendre des recherches antérieures [4 b] sur le rôle possible de cet anticorps bloquant dans le mécanisme du « phénomène de zone ».

Fréquent dans le séro-diagnostic de la brucellose, il peut se manifester de deux manières :

a) Absence d'agglutination dans les premières dilutions du sérum et agglutination dans les tubes suivants ; à la lecture le séro-diagnostic se présentera sous la forme :

Dilution du sérum . . .	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560
Résultat . . . . .	—	—	+++	+++	+++	+++	—	—	—

b) Absence d'agglutination dans des tubes compris entre deux séries de tubes agglutinés ; par exemple :

Dilution du sérum . .	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560
Résultat . . . . .	+++	+++	+++	—	—	+++	++	—	—

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 1<sup>er</sup> octobre 1953.

Ce phénomène apporte une gêne réelle à la lecture des séro-diagnostic : il oblige à pratiquer un grand nombre de dilutions, car l'absence d'agglutination peut se manifester, rarement il est vrai, dans les quatre ou cinq premiers tubes (dil. 1/160). Bien plus, et cela est plus dangereux, on peut parfois observer, chez les ruminants, l'agglutination dans le premier tube (dil. 1/10), rien dans les trois ou quatre tubes suivants et de nouveau agglutination dans un seul tube, selon le schéma :

Dilution du sérum. .	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560
Résultat . . . . .	++	—	—	—	+++	—	—	—	—

Un tel séro-diagnostic est un véritable piège pour le technicien un peu pressé qui doit lire un grand nombre de réactions dans le temps le plus bref : il risque facilement de considérer comme négative ou douteuse une telle épreuve, en réalité positive.

A. *Action du chauffage à 56° pendant trente minutes.* — Comme Schuhradt et coll. [7] l'ont établi, l'anticorps bloquant anti-*Brucella* est thermolabile.

Nous avons pu constater, sur 100 sérums humains ou animaux qui présentaient le phénomène de zone, que le chauffage à 56° de ces sérums supprimait le phénomène de zone.

B. *Action d'une forte concentration en électrolytes.* — Nous avons déjà établi [4 b], à la suite de Taylor et coll. [1], que l'emploi d'eau salée à 5 p. 100 dans la pratique du séro-diagnostic de la brucellose supprimait le phénomène de zone. Cette même concentration en électrolytes fait qu'un sérum bloquant perd sa propriété bloquante et ne peut plus être distingué d'un sérum négatif [4 a].

Cette propriété de l'anticorps bloquant d'être annihilé par une forte concentration en électrolytes permet sans doute d'expliquer une expérience de Miles [10], qui sensibilise une suspension de *Brucella* par des quantités variables d'un sérum présentant une zone et en l'absence de sels ; ces suspensions lavées flocculent correctement quand on les met en présence d'électrolytes.

C. — Si on ajoute un sérum sûrement agglutinant aux tubes de la « zone », on constate que l'agglutination y est bloquée [4 b].

Nous avons repris et vérifié les expériences de d'Alessandro [11] ; si on lave soigneusement à l'eau salée à 0,85 p. 100 l'antigène brucellique contenu dans les tubes qui présentent une zone, cet antigène sensibilisé, remis en suspension, est agglutiné spécifiquement par un sérum antiglobuline.

D. — Dans les sérums d'animaux expérimentalement infectés de brucellose, ou dans les sérums de malades qu'on a la chance de saisir avant l'apparition des agglutinines, on voit, le plus souvent, d'abord apparaître l'anticorps bloquant, puis les sérums présentent une zone, enfin ces sérums agglutinent [4, 5].

On peut voir de véritables échanges s'opérer entre agglutinines et anticorps bloquants. Par exemple, nous avons constaté, chez des chèvres naturellement infectées, les résultats suivants sur des examens hebdomadaires :

Chèvre 380, agglutination + + + 1/10, suivie d'un sérum présentant une zone jusqu'au 1/20 et agglutinant + + 1/80 et de deux sérums ne contenant que l'anticorps bloquant au 1/80.

Chèvre 382, deux sérums agglutinant respectivement au 1/20 et 1/10, puis un sérum anticorps bloquant au 1/20, le dernier agglutinant à nouveau + + + 1/10.

Chèvre 381, deux agglutinations au 1/10 (+ + +) suivies de deux sérums ne contenant que l'anticorps bloquant au 1/40 et 1/20.

Chèvre 389, trois sérums présentent des anticorps bloquants compris entre 1/10 et le 1/40, le quatrième agglutine + + 1/10.

Chèvre 363, premier examen : agglutination + + + 1/20 ; deuxième et troisième examens : anticorps bloquant au 1/80 ; quatrième examen : agglutination au 1/80 (+ +).

Nous pourrions multiplier les exemples de ce balancement entre les divers anticorps, ou les divers aspects des anticorps.

Ce faisceau concordant nous semble étayer assez fortement l'opinion que nous avons émise sur le rôle de l'anticorps bloquant dans le mécanisme du phénomène de zone.

E. *Arguments statistiques.* — Cependant, d'autres hypothèses ont été avancées pour expliquer le phénomène de zone :

- a) Existence d'un facteur propre à la souche microbienne ;
- b) Excès d'anticorps par rapport à l'antigène.

La première hypothèse a été soutenue, en particulier, par Leonardi [12] : il existe, en effet, des souches qui ne sont pas agglutinées aux faibles dilutions d'un sérum anti-*Brucella* ; cette hypothèse est sans valeur dans les cas qui nous occupent, puisqu'on doit utiliser, pour les réactions de diagnostic, une souche soigneusement sélectionnée et conservée intacte dans ses caractéristiques, telle la souche *Br. suis* S.6 (C. R. F. O., Montpellier).

La seconde hypothèse est classique ; avancée et soutenue par de nombreux auteurs, elle est soigneusement répétée d'une publication à l'autre. Une statistique assez étendue permet, croyons-nous, d'en faire justice.

767 sérums humains ou animaux sont positifs à des taux compris entre 1/20 et 1/20. 480 (antigène préparé par nos soins, souche S.6 du C. R. F. O., étalonné par le sérum Etalon International OIE-OMS : + + 1/720). 104 présentent une zone contrôlée, pour 39 d'entre eux, avec des antigènes du « Bureau of Animal Industry » (Etats-Unis) et du « Ministry of Agriculture and Fisheries » (Grande-Bretagne) ; selon le taux maximum d'agglu-

TABLEAU I. — Fréquence des « zones » d'après le taux final d'agglutination.

Taux d'agglutination	Nombre de sérums	Zones	% de Zones	% de Zones sur total des sérums (767)	% de zones sur total des zones
1:20	132	4	3	0,52	3,8
1:40	118	8	6,8	1,04	7,6
1:80	84	10	12,0	1,30	9,6
1:160	132	20	15,1	2,60	19,2
1:320	104	28	26,9	3,64	26,9
1:640	82	16	19,5	2,08	15,3
1:1280	52	6	11,5	0,79	5,7
1:2560	31	7	22,5	0,91	6,6
1:5120	17	3	17,6	0,39	2,8
1:10240	9	1	11,1	0,01	1
1:20480	6	1	16,6	0,01	1

tion constatée, ces zones se répartissent comme l'indique le tableau.

Ainsi, 115 séro-diagnostics agglutinent à des taux égaux ou supérieurs à 1/1 280, 18 d'entre eux présentent le phénomène de zone.

Ces 18 séro-diagnostics avec zone représentent 15 p. 100 du total des séro-diagnostics agglutinant fortement et 17,7 p. 100 du nombre total de séro-diagnostics ayant une zone.

D'autre part, 104 séro-diagnostics — soit 15,7 p. 100 du total des sérums — agglutinent à 1/320, 28 d'entre eux ont une zone ; ces 28 sérums représentent 26,9 p. 100 du total des sérums agglutinant au 1/320 et 26,9 p. 100 du total des sérums qui ont une zone.

Les mêmes calculs peuvent être faits pour chaque série de séro-diagnostics. Ils permettent de dresser les graphiques ci-joints.

Il apparaît ainsi clairement que, s'il y a un rapport net entre le taux final d'agglutination et la fréquence du phénomène de zone, ce serait surtout aux taux moyens d'agglutination que ce rapport serait évident.

L'anticorps bloquant joue donc un rôle réel dans le phénomène d'agglutination paradoxale des sérums de sujets atteints de brucellose. Un point reste encore mystérieux ; pourquoi cet anticorps bloquant paraît-il manifester une aptitude plus grande à se fixer sur les cellules microbiennes, quelle est la raison de cette « avidité » réciproque qui contraste avec les taux généralement faibles de son activité ?



CONCLUSION. — Nos connaissances sur l'anticorps bloquant dans la brucellose sont encore incomplètes : nous ignorons, par

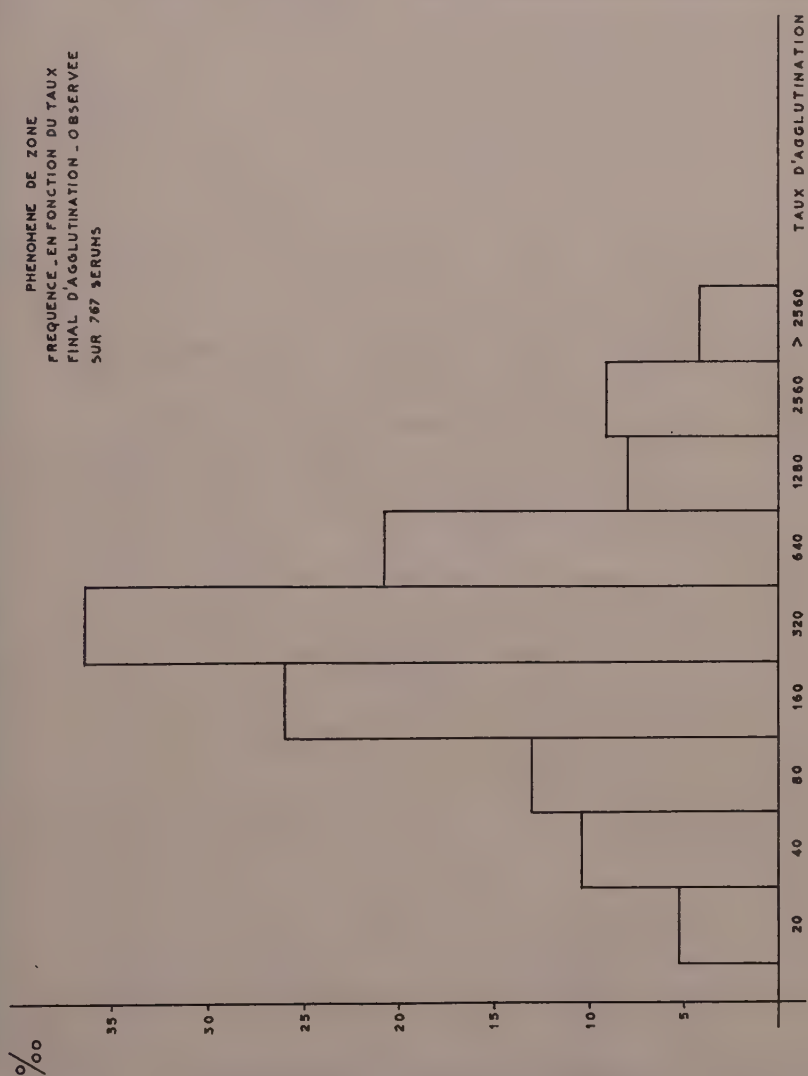


Fig. 1.

exemple, la fraction protidique qui en est le support, nous ignorons pourquoi cet anticorps mélangé à l'anticorps agglutinant se fixe préférentiellement sur l'antigène.

Les propriétés que nous lui connaissons : thermolabilité, inhibition par un excès d'électrolytes, fixation spécifique sur l'anti-

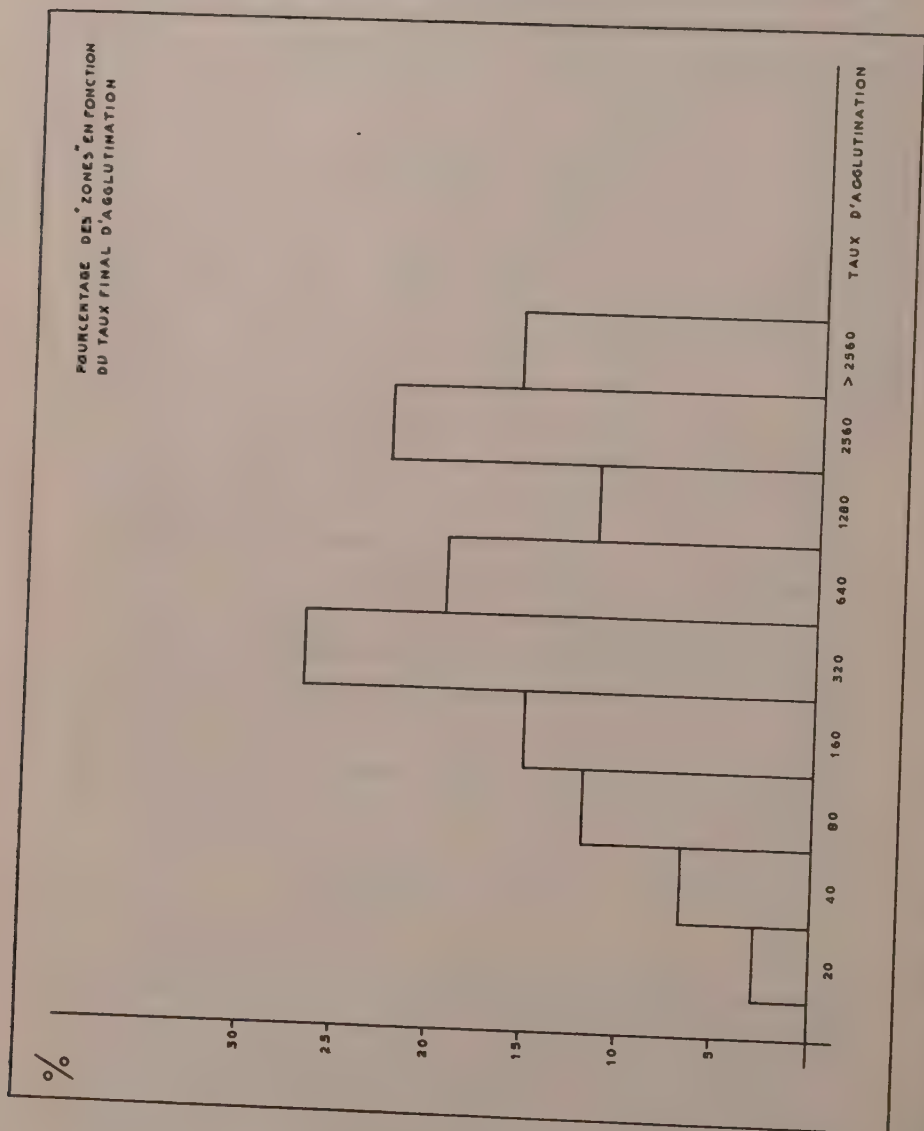


FIG. 2.

gène microbien, permettent de retrouver cet anticorps dans les sérums qui présentent le phénomène dit de zone ou d'agglutination paradoxale. Les arguments expérimentaux ainsi obtenus sont

confirmés par un argument statistique qui montre que l'existence d'une zone dans un sérum donné n'est pas en rapport avec le

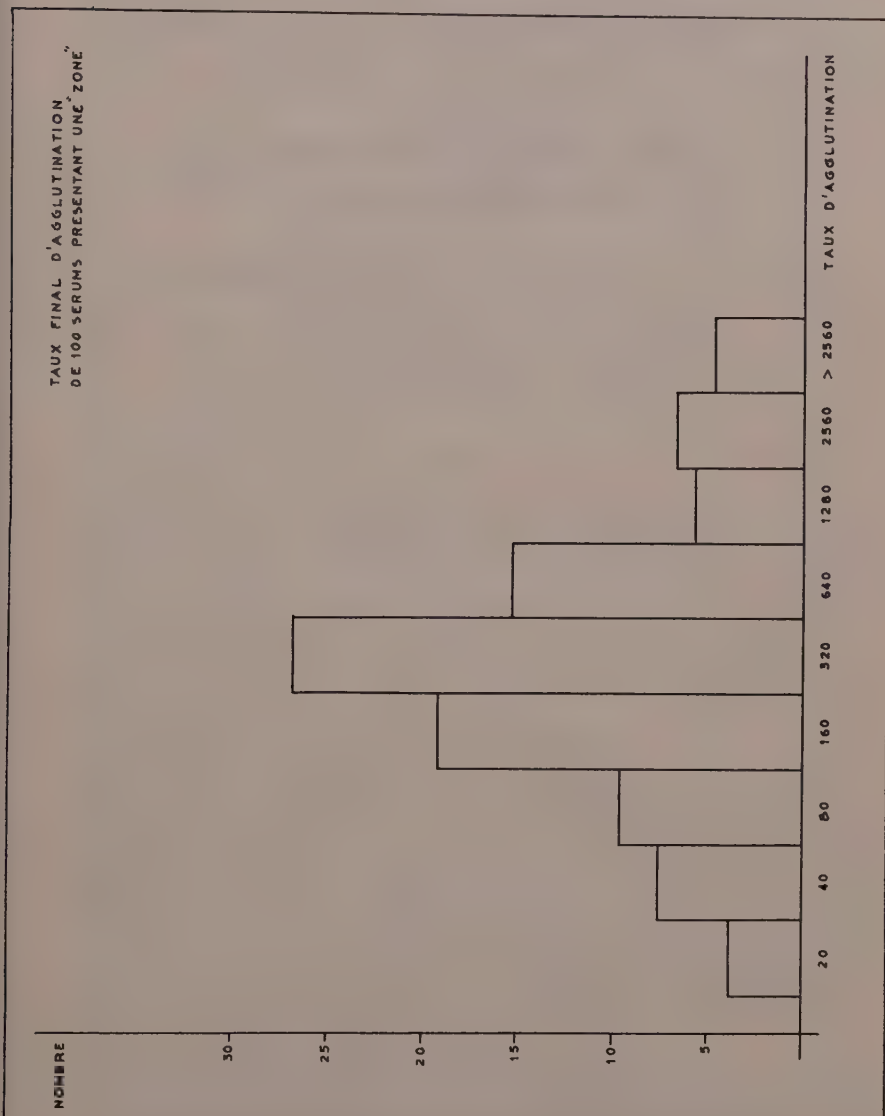


FIG. 3.

taux final d'agglutination, comme le voudrait la théorie qui attribue cette agglutination paradoxale des sérums brucelliques à un excès d'anticorps.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. M. TAYLOR, M. LISBONNE, L. F. VIDAL et R. H. HAZEMANN. *Bull. organ. Hyg. SDN*, 1938, **7**, 503.
- [2] J. J. GRIFFITS. *Publ. Health Rep.*, 1947, **62**, 865.
- [3] C. D. COX et L. J. KUTTNER. *Science*, 1950, **111**, 545.
- [4 a] G. RENOUX. *Ces Annales*, 1950, **78**, 798.
- [4 b] G. RENOUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 232.
- [5] L. CARRÈRE et G. RENOUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 103.
- [6] M. M. WILSON et E. V. O. MERRIFIELD. *Lancet*, 1951, **261**, 913.
- [7] V. T. SCHUHARDT, H. W. WOODFIN et K. C. KNOLLE. *J. Bact.*, 1951, **61**, 299.
- [8] L. O. JONES et M. M. WILSON. *Nature*, 1951, **167**, 558.
- [9] W. H. HALL et R. E. MANION. *J. clin. Invest.*, 1953, **32**, 96.
- [10] A. A. MILES. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 63.
- [11] G. D'ALESSANDRO et G. CELANO. *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1950, **29**, 173.
- [12] P. LEONARDI. *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1948, **27**, 58.



# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 5 novembre 1953.

Présidence de M. GASTINEL.

---

## PRÉSENTATION D'OUVRAGES

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société le livre de R. Dujarric de la Rivière et A. Eyquem sur les groupes sanguins chez les animaux (\*).

Pour les avoir entendu rapporter ici, nos collègues connaissent bien la substance des recherches poursuivies par ces auteurs qui ont apporté une contribution essentielle à nos connaissances sur les groupes sanguins des animaux. Il s'agit là d'une étude qui s'est développée à partir des notions acquises chez l'homme grâce à l'ensemble des recherches poursuivies à la suite des travaux de Landsteiner : on pouvait se demander si les mammifères supérieurs présenteraient dans la constitution de leurs groupes sanguins une homogénéité plus grande que l'espèce humaine : il n'en est rien.

Dans leur ouvrage, les auteurs commencent par rappeler les données générales sur les groupes sanguins de l'homme avec leurs caractères biologiques et biochimiques. Ils rappellent également les lois de l'hérédité qui conditionnent la transmission génétique des groupes sanguins et développent avec toutes les précisions nécessaires les méthodes d'étude et les techniques qui permettent de reconnaître les différents génotypes d'un système sanguin. Ils consacrent à l'antigène Forssman un chapitre d'ensemble, puis étudient successivement les groupes sanguins chez les différentes espèces : oiseaux, ongulés, carnivores, rongeurs, primates, etc. Dans les deux derniers chapitres de l'ouvrage, ils étudient la maladie hémolytique des animaux ainsi que les troubles dus à la perméabilité placentaire, et enfin les antigènes tissulaires et les anticorps cytotoxiques.

On voit ainsi que les auteurs n'ont pas limité strictement leur étude à la diagnose des groupes sanguins des animaux, mais qu'ils ont su envisager le problème dans toute son envergure et faire de leur travail

(\*) R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et A. EYQUEM, *Les groupes sanguins chez les animaux (Individualités sanguine et tissulaire)*, Editions Médicales Flammarion, 22, rue de Vaugirard, Paris-6<sup>e</sup>, 1953, 407 pages.

un traité extrêmement complet et documenté, éclairé par leur expérience et leur contribution au sujet.

La bibliographie, très complète, occupe 28 pages à la fin de l'ouvrage ; c'est dire avec quel soin elle a été établie. Il est à présumer que cet ouvrage, appelé à rendre de grands services, deviendra rapidement classique et qu'il connaîtra plusieurs éditions successives.

**M. Lépine :** J'ai l'honneur de présenter à la Société au nom de son auteur, le Dr M. Déparis, professeur agrégé à la Faculté de Médecine et médecin des hôpitaux de Paris, l'*Etude sur l'épidémiologie de la poliomyélite* (\*) qui vient de paraître.

Nos connaissances sur l'épidémiologie de la poliomyélite ont commencé à évoluer lorsqu'en 1928 il est devenu évident que les théories classiques ne suffisaient pas à expliquer la diffusion et la contagion de cette affection. D'autre part, au cours des dernières années, le caractère même de la poliomyélite a changé profondément. Enfin, de récentes techniques introduites dans l'étude expérimentale de la maladie ont permis de renouveler les méthodes appliquées à l'épidémiologie de la poliomyélite et de mieux faire comprendre les raisons restées mystérieuses de son augmentation constante dans tous les pays civilisés.

Aussi le moment était-il venu de consacrer à l'épidémiologie de la poliomyélite une étude résumant les questions actuelles. L'ouvrage du Dr Déparis le fait de la façon la plus documentée et la plus minutieuse.

Dans la première partie de son ouvrage consacrée à l'épidémiologie générale, il analyse les modes possibles de contamination, les facteurs favorisants ou occasionnels, les exemples tirés de collectivités, l'influence du terrain, le comportement des foyers épidémiques.

Dans une deuxième partie, l'auteur reprend la clinique de la poliomyélite et lui apporte les corrections à la faveur des notions acquises au cours de ces dernières années. Il étudie la corrélation entre les formes cliniques, la morbidité et la mortalité.

Une troisième partie rapporte les méthodes les plus récentes d'identification du virus, soit par l'isolement de ce dernier, soit par la méthode sérologique, et donne en même temps une brève description du virus coxsackie que tant de facteurs épidémiologiques obligent à rapprocher du virus de la poliomyélite.

Enfin, dans une quatrième et dernière partie, l'auteur établit le schéma de la lutte contre la poliomyélite et les règles de la prophylaxie qui découlent des notions exposées dans les chapitres précédents.

A propos de chacun des points étudiés, l'auteur ne s'est pas contenté des notions tirées d'une documentation livresque, mais il a fait les rapprochements avec les cas qu'il a eu l'occasion d'observer et les foyers qu'il lui a été donné d'examiner. Il a su ainsi donner un tour très vivant aux descriptions qu'il apporte, tout en étayant les faits cités sur une bibliographie solide et complète qui donne au lecteur le moyen de remonter aux sources de la documentation. L'exposé est clair et plaisant, la bibliographie complète et soigneusement établie. La documentation statistique est suffisante pour emporter la conviction du lecteur, bref le livre répond complètement au but que s'est

(\*) M. DÉPARIS, *Etude sur l'épidémiologie de la poliomyélite*, Masson et Cie, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6<sup>e</sup>, 1953, 162 pages.

proposé l'auteur. Il m'est particulièrement agréable de le féliciter de cette étude qui lui fait grand honneur, et qui est sans aucun doute appelée à un vif succès auprès des cliniciens comme des épidémiologistes ou du corps médical enseignant.

## COMMUNICATIONS

### ESSAIS DE TRAITEMENT PAR QUELQUES ANTIBIOTIQUES DE LA BRUCELLOSE EXPÉRIMENTALE DU RAT BLANC

par H. JACOTOT et A. VALLÉE.

(Aide-technique A. LE PRIOL.)

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie animale.*)

Dans un travail antérieur nous avons montré que, sous certaines modalités, l'inoculation au rat blanc de matériel brucellique était suivie d'effets assez rapides, constants et précis pour autoriser l'emploi de ce petit animal dans l'étude expérimentale des brucelloses [4].

Dans les expériences qui seront rapportées ci-dessous, nous nous sommes proposé d'étudier les effets, sur l'évolution de la brucellose expérimentale de ce même rat blanc, de la terramycine, de la dihydrostreptomycine, de la sulfadiazine, seules ou en association ; l'action d'un immunosérum brucellique préparé chez une brebis et administré seul ou en association a été éprouvée de surcroît.

Les animaux utilisés étaient des rats de race commune ou de race Wistar pesant, au départ, 180 g environ. Ils ont été infectés par voie péritonéale avec des souches de *Br. abortus* d'origine bovine, peu agressives, et dont on pouvait penser qu'elles n'entraîneraient pas la mort dans les délais d'application de la thérapeutique choisie.

Le traitement était commencé un ou deux jours après l'inoculation infectante ; on le poursuivait pendant dix jours, dimanche non compris, selon les protocoles indiqués ci-dessous :

Terramycine : 15 mg par jour en une injection intrapéritonéale.

Dihydrostreptomycine : 4 mg par jour en une injection intramusculaire.

Sulfadiazine : 12 mg par jour par voie buccale.

Sérum : 0,5 cm<sup>3</sup> par jour en une injection sous-cutanée.

Enfin les survivants ont été sacrifiés ultérieurement, pour autopsie et recherche des brucelles.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — L'infection est réalisée par injection intrapéritonéale d'une suspension hépatosplénique au 1/10 ; le matériel virulent a été fourni par un rat dont le foie et la rate ont donné

des cultures pures de brucelles (souche L), mais ne présentaient pas d'altérations macroscopiques.

Tous les rats traités surmontent l'infection sans présenter de troubles. Dans chaque série on en sacrifie 2 après trois mois, 2 après quatre mois, 2 après dix ou onze mois ; à l'exception de 2 d'entre eux chez lesquels on note une légère splénomégalie, aucun de ces rats ne présente de lésions d'aucune sorte. Les 9 témoins résistent eux aussi et sans troubles ; on les sacrifie dans les mêmes délais ; 3 d'entre eux présentent de la splénomégalie.

Lesensemencements ou inoculations pratiqués à partir des rates, foies et moelles de ces divers animaux donnent des résultats positifs dans les proportions suivantes, dans chaque série et dans chaque groupe :

TRAITEMENT PAR	NOMBRE de rats	ANIMAUX SACRIFIÉS APRÈS :		
		3 mois	4 mois	10 à 11 mois
Terramycine . . . . .	6	1 sur 2	1 sur 2	1 sur 2
Didromycine . . . . .	6	2 sur 2	2 sur 2	2 sur 2
Sulfadiazine . . . . .	6	1 sur 2	0 sur 2	1 sur 2
Sérum . . . . .	6	1 sur 2	2 sur 2	0 sur 2
Terramycine + Didromycine + Sulfadiazine . . . . .	5	0 sur 2	0 sur 2	0 sur 1
Même association + Sérum . . . . .	6	0 sur 2	0 sur 2	1 sur 2
Témoins non traités . . . . .	9	3 sur 3	3 sur 3	0 sur 3

Nous tirerons de cette expérience les conclusions suivantes : seule la triple association a produit les effets recherchés, stérilisant tous les animaux qui en ont bénéficié, et de façon définitive. La terramycine et la sulfadiazine employées seules et les trois antibiotiques employés ensemble en association avec le sérum ont stérilisé une partie des animaux mais, semble-t-il, en troublant la défense naturelle de l'organisme puisque dans chacune de ces séries les rats sacrifiés après dix ou onze mois ont donné desensemencements positifs dans la proportion de 1 sur 2 alors que dans la série des témoins la défense naturelle conduisait à la stérilisation dans les mêmes délais.

Les rats qui ont reçu le sérum seul se sont comportés comme les témoins, ou à peu près. La dihydrostreptomycine paraît avoir entravé la défense naturelle sans entraîner, à aucune période, la stérilisation.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — L'infection est obtenue par injection intrapéritonéale d'une suspension de brucelles additionnée de mucine ; chaque animal reçoit 10 000 000 000 de germes (souche D) et 0,33 cm<sup>3</sup> de mucine au 1/20.

Cette inoculation est plus sévère que celle de l'expérience précédente : sur un total de 58 rats inoculés, 10 meurent avant le commencement du traitement, dans les quarante-huit heures, et 4 autres avant la fin du traitement.



Au cours des semaines suivantes un certain nombre de rats sont morts ; les survivants ont été sacrifiés cinq mois après l'inoculation. Les observations de ces deux catégories d'animaux ont été condensées dans ce tableau :

TRAITEMENT PAR	NOMBRE de rats	ANIMAUX MORTS Recherche de brucelles		ANIMAUX SACRIFIÉS Recherche de brucelles	
		positive	négative	positive	négative
Terramycine . . . . .	5				5
Didromycine . . . . .	4				4
Sulfadiazine . . . . .	6	1 (dernier jour).			5
Sérum . . . . .	3	3 <sup>e</sup> , 8 <sup>e</sup> , 10 <sup>e</sup> jours du trait.			
Terramycine et Sérum.	5	1 (4 mois).			3
Didromycine et Sérum.	6	6 (5 à 8 semaines)	1 (4 mois).		
Sulfadiazine et Sérum.	5	2 (17 et 56 jours).	3 (1, 26 et 56 jours).		
Trois antibiotiques et Sérum . . . . .	4				4
Témoins non traités .	6	3 (1 jour, 1 jour et 11 jours).	1 (2 jours).		2

De l'examen de ce tableau la conclusion se dégage que l'action curative stérilisante des antibiotiques s'est exercée chez tous les rats avec une seule exception, pour la sulfadiazine, et qu'elle a été entravée par l'administration simultanée d'immunsérum (dans tous les cas pour la didromycine et la sulfadiazine, dans 2 cas sur 5 pour la terramycine). Mais le sérum qui seul s'est révélé, par ailleurs, dépourvu de toute action sur l'infection brucellique n'a pu contrarier l'action des trois antibiotiques associés. Cette association a entraîné la guérison chez tous les animaux.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — On injecte à chaque rat, toujours par voie péritonéale, un mélange de mucine au 1/20 (1 cm<sup>3</sup>) et de pus brucellique au 1/75 (0,5 cm<sup>3</sup>) ; ce matériel a été prélevé quelques jours avant sur le cadavre d'un rat porteur de plusieurs gros abcès abdominaux (souche Ch.).

L'épreuve cette fois est encore plus sévère ; bien que la brucelle en cause soit peu agressive, le matériel virulent se révélera générateur de graves désordres et de lésions très importantes, comparables à celles que nous avons décrites dans notre précédent travail.

Indépendamment du traitement antibiotique tous les rats recevront, un jour sur deux, 0,5 cm<sup>3</sup> d'immunsérum.

Les rats survivants des diverses séries seront sacrifiés après quatre mois (témoins) ou cinq mois (traités). Les résultats des examens sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

TRAITEMENT PAR	NOMBRE de rats	ANIMAUX MORTS Recherche de brucelles		ANIMAUX SACRIFIÉS Recherche de brucelles	
		positive	négative	positive	négative
Terramycine et Sérum.	4	—	1 (1 jour).	—	2 (sans lésions).
Didromycine et Sérum.	4	—	1 (3 mois) +	—	3 (sans lésions).
Sulfadiazine et Sérum.	4	—	1 (3 mois) +	—	2 (sans lésions).
Trois antibiotiques et Sérum . . . . .	7	—	2 (3 mois sans lésions).	—	—
Témoins . . . . .	8	4 (2 à 4 mois) +.	—	1 +	7 (sans lésions). 3 (séquelles chez l'un).

+ , animaux porteurs de lésions importantes.

De ce tableau il ressort, en ce qui concerne les témoins : 1° que 4 sur 8 sont morts ; 2° que 6 sur 8 présentaient à l'autopsie d'importantes lésions ; 3° que chez 5 sur 8 la brucelle a été mise en évidence ; et en ce qui concerne les traités : 1° que sur un total de 19, 5 sont morts, 2 seulement présentant des lésions de brucellose, d'ailleurs importantes ; 2° que chez aucun la brucelle n'a pu être mise en évidence ; 3° que seule l'association des trois antibiotiques a permis la guérison sans lésions de tous les rats traités, au nombre de 7.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. — Dans la brucellose expérimentale du rat blanc, la terramycine, la dihydrostreptomycine et la sulfadiazine employées seules exercent une action plus ou moins prononcée selon la gravité de l'infection, la terramycine produisant les effets les plus marqués et la dihydrostreptomycine les effets les moins marqués, en général. L'association de ces trois antibiotiques entraîne toujours la guérison.

Chez un grand nombre de sujets l'administration simultanée d'immunsérum entrave l'action des antibiotiques employés isolément ; elle ne modifie qu'exceptionnellement les effets de leur association.

Il semblerait que, dans les circonstances où ces antibiotiques administrés isolément n'ont que des effets partiels, leur emploi puisse troubler la défense de l'organisme contre l'infection, et particulièrement empêcher ou retarder la stérilisation des parenchymes. Il est vraisemblable qu'en pareil cas l'antibiotique, contrariant l'établissement de l'immunité, notion généralement admise, laisse le sujet sans défense vis-à-vis de germes qui ont résisté à son action.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. JACOTOT et A. VALLÉE. Ces *Annales*, 1954, **86**, 29.

## SUR UN CAS DE MYXOMATOSE CHEZ LE LIÈVRE

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie animale.)

La myxomatose est généralement considérée comme une maladie particulière aux lapins. Cependant, Kessel, Fisk et Prouty ont signalé qu'elle pouvait être transmise expérimentalement au lièvre, mais exceptionnellement [1].

Par deux fois nous avons essayé d'inoculer le myxome de Sanarelli à des animaux de cette espèce ; il s'agissait de deux adultes, un lièvre de Yougoslavie et une hase d'Alsace. L'un et l'autre ont supporté sans aucun trouble les inoculations virulentes qui leur ont été faites.

En revanche nous avons pu examiner un lièvre qui avait contracté naturellement la maladie.

C'était une hase de 15 à 18 mois de la région de Vendôme (Loir-et-Cher), pesant 3,300 kg ; elle se déplaçait avec peine lorsqu'elle fut abattue d'un coup de fusil, au mois de septembre 1953.

*Examen nécropsique.* — L'aspect de l'animal est tout à fait caractéristique : blépharite bilatérale sans muco-pus ; œdème de l'extrémité de la face ; œdème ano-vulvaire important, escarrifié ; très nombreux myxomes nummulaires ou nodulaires sur la tête, à la base des oreilles, à la base du cou, le long et aux extrémités des pattes (au total plus de 50 myxomes). Les viscères ne présentent aucune altération.

*Isolement du virus.* — On prélève un myxome et on fait une suspension au 1/10 pour inoculer quatre lapins ; deux de ces lapins (55 et 56) reçoivent sous la peau du front 0,5 cm<sup>3</sup> de la suspension ; ils mourront de myxomatose onze et treize jours après. Les deux autres (57 et 58) sont inoculés par voie percutanée ; pour cela, avec une aiguille d'histologie, ayant 1 mm de pénétration, on pratique 5 piqûres à la face interne de la cuisse après avoir, chaque fois, plongé l'aiguille dans la substance du même myxome. Le lapin 57 mourra de myxomatose quatorze jours après ; le lapin 58 reste indemne ; réinoculé ultérieurement par voie sous-cutanée, il contractera une myxomatose mortelle en douze jours.

Sur les oreilles et le cou du lièvre on avait trouvé de nombreuses tiques fixées (*Ixodes ricinus*) ; quelques-unes, gorgées de sang, furent recueillies et placées à la glacière. Le surlendemain on en broyait quatre et, après addition d'antibiotique à la suspension, on inoculait un lapin par voie sous-cutanée ; cet animal fit une myxomatose mortelle en neuf jours.

Enfin le titrage par inoculation à des lapins de suspensions progressivement diluées nous a conduits à constater que la substance des myxomes contenait environ 1 000 unités virulentes par gramme ; c'est une teneur relativement faible.

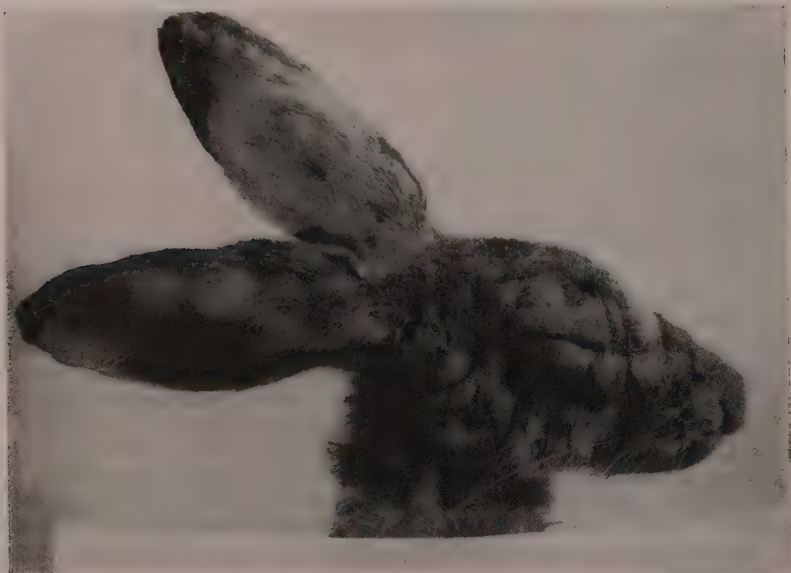
*Examen histologique.* — Des fragments de tissus bloqués en paraffine furent confiés à notre collègue le Dr J. Levaditi. Celui-ci, que nous

remercions de sa précieuse collaboration, y mit en évidence les altérations du système réticulo-endothélial qu'a décrites Ahlström chez le lapin myxomateux. Nous en résumerons ici la lecture.

**Myxome cutané :** Le derme et l'hypoderme hyperplasiés, en état d'inflammation subaiguë, offrent une image typique.

**Rate :** Réticulose intense ; congestion avec présence de nombreux lymphocytes, plasmocytes et macrophages riches en pigment ; les follicules et les sinus sont effacés.

**Foie :** Les sinusoides sont dilatées par l'accumulation de cellules



*Lièvre ayant contracté naturellement la myxomatose.*  
(Cliché Institut Pasteur.)

réticulées, gonflées, irrégulières et dont certaines ont l'aspect de cellules myxomateuses.

**Ganglion :** Le ganglion est le siège d'une réticulose intense effaçant les follicules et les sinus ; inflammation des lymphatiques afférents et nappes de cellules réticulées périganglionnaires. Les cellules réticulées altérées, les macrophages granuleux, les plasmocytes sont éparés dans un exsudat inter-cellulaire. Certains macrophages ont l'aspect des cellules myxomateuses.

**Résumé.** — L'observation que nous rapportons corrobore les résultats expérimentaux mentionnés par Kessel, Fisk et Prouty ; elle confirme la constatation faite tout récemment en France par Magalon et Bazin [2]. Le lièvre est susceptible de contracter la myxomatose sous



sa forme classique entraînant la mort ; mais il n'est pas douteux que c'est là un événement exceptionnel et que, d'une manière générale, les animaux de cette espèce restent insensibles au virus de Sanarelli, dans la nature aussi bien qu'au laboratoire. La position des lièvres vis-à-vis de la myxomatose paraît être, à peu de chose près, l'inverse de celle des lapins d'Europe, les premiers contractant exceptionnellement la maladie, les seconds lui étant exceptionnellement réfractaires (1).

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] KESSEL, FISK et PROUTY. *Proceed. Fifth Pacific Science Congress*, 1933, University of Toronto Press, 1934, p. 2930.  
[2] MAGALON et BAZIN. Académie Vétérinaire de France, séance du 1<sup>er</sup> octobre 1953.

**IMMUNITÉ ET SPÉCIFICITÉ  
DES IMMOBILISINES RÉCURRENTIELLES  
ENTRE *BORRELIA DUTTONI* ET *BORRELIA HISPANICA***

par A. VAISMAN et A. HAMELIN.

(Institut Alfred Fournier.)

Lorsque C. Levaditi, A. Vaisman et A. Hamelin ont confirmé [1] les résultats fournis par l'application de la méthode de Nelson et Mayer [2] au séro-diagnostic de la syphilis, ils se sont demandé si ces « immobilisines » étaient spécifiques à l'égard des différents genres, espèces et variétés de spirochètes. Etant donné les difficultés rencontrées jusqu'ici pour obtenir des souches de *Treponema pallidum* utilisables dans ce but, ils se sont adressés, pour étudier ce problème, aux spirochètes récurrentiels.

Après avoir mis en évidence [3] la présence d'*immobilisines anti-récurrentielles* dans le sérum de souris, de rats et de cobayes infectés expérimentalement soit par *Borrelia duttoni*, soit par *Borrelia hispanica*, ces auteurs [4] ont démontré que cette activité immobilisante est seulement homologue et non hétérologue. En effet, de tels sérums se montrent totalement inactifs ou, tout au plus, partiellement doués de potentiel immobilisant à l'égard de spirilles appartenant à une espèce différente de celle qui a servi d'antigène. Il en résulte que

(1) La surprise causée par l'apparition de la myxomatose chez le lièvre fut si grande en France que certains se demandèrent si quelque erreur n'entachait pas la détermination zoologique des sujets observés ; il n'en était rien. La hase que nous avons examinée était totalement dépourvue de l'os interpariéto-occipital qui caractérise les lapins. La présence de cet os cranien chez les lièvres non adultes explique qu'une certaine confusion ait pu régner sur ce sujet pendant un temps.

l'utilisation de la réaction des immobilisines sériques, selon la méthode de Nelson et Mayer, permet de différencier du point de vue immunologique des espèces de spirillacées telles que *Borrelia duttoni* et *Borrelia hispanica*.

La dite méthode pourra éventuellement être utilisée pour identifier des souches tréponémiques biologiquement dissemblables.

Le problème de la spécificité des immobilisines résolu, nous avons cherché s'il en était de même en ce qui concerne la résistance à la réinfection et nous exposons dans la présente note les résultats acquis.

#### I. — RÉINFECTION AVEC SOUCHE HOMOLOGUE.

a) Souche « *duttoni* ». — Un lot de souris est infecté par voie intrapéritonéale avec du sang riche en *Borrelia duttoni*. Dans les jours suivant cette inoculation, on recherche la présence de spirochètes dans le sang des animaux, vérifiant ainsi la réalité de l'infection.

Trois mois après cette primo-inoculation, la circulation sanguine ne contenant plus, depuis longtemps, de spirochètes, mais des immobilisines anti-*Borrelia duttoni* s'étant développées, ce lot de souris est réinfecté dans les mêmes conditions, avec la souche homologue, en même temps qu'un deuxième lot de souris neuves, servant de témoins. Le sang de ces animaux est examiné tous les deux jours pendant trois semaines. Alors que chez les témoins on constate l'apparition d'une crise spirillaire dès le deuxième jour, les souris réinfectées n'ont jamais présenté de parasites dans leur sang pendant toute la durée de trois semaines d'observation, temps suffisamment long pour exclure toute possibilité d'infection retardée.

b) Souche « *hispanica* ». — Dans les mêmes conditions expérimentales, les souris infectées avec *Borrelia hispanica* et réinfectées avec la souche homologue se sont montrées réfractaires à cette deuxième inoculation, leur sang contenant des immobilisines anti-*hispanica* développées à la suite de la primo-infection.

#### II. — RÉINFECTION AVEC SOUCHE HÉTÉROLOGUE.

a) Primo-infection souche « *duttoni* ». Réinfection souche « *hispanica* ». — Un lot de souris infectées avec la souche *duttoni*, chez lesquelles on a vérifié la véracité de l'infection par la constatation des spirochètes dans le sang et le développement des immobilisines anti-*duttoni*, est réinfecté, trois mois après, avec des *Borrelia hispanica* en même temps que des souris témoins.

L'examen du sang de ces animaux montre que les souris réinfectées avec une souche hétérologue se comportent comme les souris neuves, c'est-à-dire, apparition des spirochètes dans la circulation dès le deuxième jour après la réinoculation.

b) Primo-infection souche « *hispanica* ». Réinfection souche « *duttoni* ». — Les souris infectées avec *Borrelia hispanica* et réinfectées trois mois après par *Borrelia duttoni* se sont comportées comme les animaux neufs, ne présentant aucune immunité vis-à-vis de la deuxième souche.

CONCLUSIONS. — L'apparition d'immobilisines homologues dans le sérum des animaux infectés, soit par *Borrelia duttoni*, soit par *Borrelia*

hispanica, entraîne, pour ceux-ci, un état réfractaire à une nouvelle inoculation de la même souche.

De même que cette activité immobilisante est exclusivement homologue, de même, l'état réfractaire qui se développe chez l'animal après une primo-infection ne joue que vis-à-vis d'une réinoculation de spirochètes de même espèce, et ne révèle aucune immunité hétérologue.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI. *La Presse Médicale*, 1951, **59**, 1361. — A. VAISMAN et A. HAMELIN. *Ibid.*, 1951, **59**, 1418.
- [2] NELSON et MAYER. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 369.
- [3] C. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 256.
- [4] A. VAISMAN, A. HAMELIN et C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1953, **84**, 774.

### INFLUENCE DE L'AGITATION MÉCANIQUE SUR LA FIXATION DE L'ANTICORPS IMMOBILISANT

par J. THIVOLET et M. ROLLAND

avec la collaboration technique de M<sup>me</sup> DAUDET et M<sup>lle</sup> GAILLARD).

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon  
[professeur R. SOHIER].)

Une des caractéristiques de la réaction d'immobilisation des tréponèmes de Nelson et Mayer est la lenteur avec laquelle l'immobilisation se complète et s'achève.

Les travaux de R. A. Nelson, de M. Mayer, L. Barron et M. Seldeen ont démontré que cette lenteur inhabituelle était due à un retard considérable dans la fixation de l'anticorps immobilisant sur le tréponème. La fixation du complément se fait par contre dans des délais normaux.

C'est ainsi que les études cinétiques de L. Barron ont montré que l'union des tréponèmes avec l'anticorps immobilisant demandait environ vingt-quatre heures avant d'être complète. Nous avons étudié l'effet de l'agitation mécanique sur la phase de sensibilisation en partant de l'hypothèse que le brassage du mélange constitué par l'émulsion de tréponèmes et par un sérum contenant des anticorps immobilisants pouvait favoriser la rencontre des molécules d'anticorps avec les tréponèmes et, par conséquent, la fixation de celles-ci sur les tréponèmes.

Nous avons pour cela utilisé un agitateur réalisant 80 à 100 allers et retours à la minute d'une amplitude de 15 cm environ. Sur cet agitateur, était placé le vase à vide contenant les tubes renfermant les mélanges étudiés. Dans la même étuve à 35° où se trouvait l'agitateur, nous placions un autre vase à vide contenant les tubes témoins non agités.

Dans une première expérience, nous avons utilisé une émulsion de

tréponèmes contenant 2 à 3 T. P. par champ avec un oculaire n° 5 et un objectif n° 6 à fond noir. Cette émulsion a été mélangée après être restée douze heures à l'étuve à 35° avec différentes dilutions de sérum positif et négatif en présence ou en l'absence de complément.

Chaque série de tubes a été faite en double. Une série a été agitée pendant trois heures à l'étuve à 35°, l'autre série n'a pas été agitée et est simplement restée pendant trois heures également à l'étuve. La lecture a alors été faite avec les résultats suivants (tableau I).

TABLEAU I. — Immobilisation obtenue après trois heures de sensibilisation et trois heures de fixation du complément.

Tube n°	Sérum 0,05	C' 0,10	Emulsion 0,4	Immobilisation	
				Série agitée	Série témoin
1	Sérum + pur	+	0,4	2 %	32 %
2	-id-	-	0,4	10 %	8 %
3	Sérum + au 1/2	+	0,4	8 %	4 %
4	Sérum + au 1/5	+	0,4	4 %	10 %
5	Sérum -	-	0,4	4 %	4 %
6	/	/	0,6	4 %	4 %

Ainsi le seul taux d'immobilisation pouvant être retenu (32 p. 100) fut obtenu dans le tube non agité contenant du sérum positif non dilué.

Mais cette expérience montre également que l'agitation n'exerce aucune action nocive sur la survie des tréponèmes.

La période d'agitation et de présensibilisation nous ayant semblé trop courte dans cette première expérience, nous avons essayé de porter la période de présensibilisation à six heures en la faisant suivre d'une période de fixation du complément de quinze heures, soit vingt et une heures au total dans les mêmes conditions que précédemment.

TABLEAU II. — Immobilisation obtenue après six heures de sensibilisation et quinze heures de fixation du complément.

Tube n°	Sérum + dilué à	C' 0,10	Emulsion 0,4	Immobilisation	
				Série agitée	Série témoin
1	1/11	/	0,4	4 %	4 %
2	1/11	+	0,4	100 %	92 %
3	1/33	+	0,4	80 %	69 %
4	1/99	+	0,4	60 %	62 %
5	1/281	+	0,4	6 %	42 %
6	1/891	+	0,4	2 %	27 %

De cette expérience, il ressortait que l'agitation avait retardé l'immo-



bilisation dans certains tubes (5 et 6) correspondant aux dilutions les plus étendues (1/281 et 1/891).

Nous avons répété cette expérience dans des conditions à peu près analogues avec un plus grand nombre de sérums.

Après une présensibilisation d'une durée de cinq heures, le complément a été rajusté et des lectures ont été faites après deux heures trente et cinq heures trente de fixation du complément.

TABLEAU III. — Immobilisation obtenue après cinq heures de sensibilisation et un délai variable de fixation de complément.

Tube n°	Sérum 0,20	C' 0,10	Emulsion 0,4	Immobilisation			
				Série 2h30	agitée 5h30	Série 2h30	témoin 5h30
1	—	--	0,4	4 %	4 %	4 %	4 %
2	Sérum témoin + au 1/2	+	0,4	66 %	80 %	88 %	100 %
3	-- au 1/4	+	0,4	8 %	40 %	44 %	84 %
4	-- au 1/10	+	0,4	4 %	4 %	6 %	12 %
5	-- au 1/14	+	0,4	6 %	8 %	4 %	4 %
6	Sérum n°2053	+	0,4	0 %	6 %	8 %	10 %
7	—	-	0,4	2 %	4 %	8 %	8 %
8	Sérum n°2061	+	0,4	10 %	12 %	6 %	8 %
9	—	-	0,4	5 %	10 %	6 %	8 %
10	Sérum n°2105	+	0,4	8 %	15 %	10 %	31 %
11	—	-	0,4	4 %	4 %	4 %	6 %
12	Sérum n°2117	+	0,4	8 %	12 %	6 %	6 %
13	—	-	0,4	6 %	10 %	8 %	6 %
14	Sérum n°2124	+	0,4	6 %	8 %	4 %	6 %
15	—	-	0,4	6 %	8 %	8 %	6 %
16	Sérum n°2132	+	0,4	4 %	6 %	6 %	4 %
17	—	-	0,4	6 %	6 %	6 %	6 %
18	Sérum n° 687	+	0,4	4 %	6 %	8 %	8 %
19	—	-	0,4	6 %	4 %	4 %	6 %

Dans cette expérience, l'agitation a retardé l'immobilisation d'une façon significative (tubes 2, 3, 4, 5 et 10). Ce retard déjà net après deux heures trente de fixation du complément s'était précisé après cinq heures trente. Contrairement à l'expérience précédente, qui comportait une longue période de fixation du complément, le retard a porté sur les tubes contenant une grande quantité d'anticorps, car c'est dans ces tubes seulement que la réaction pouvait démarrer pendant la courte période de fixation du complément.

EN RÉSUMÉ. — La lenteur avec laquelle se déroule le phénomène d'immobilisation créant une gêne non négligeable pour la mise en œuvre de la méthode de Nelson-Mayer, il y avait intérêt à rechercher dans quelle mesure on pourrait accélérer la fixation de l'anticorps

immobilisant sur le tréponème. L'agitation à laquelle a été soumis le mélange de sérum syphilitique à diverses dilutions et de suspension tréponémique dans différentes conditions a diminué nettement le taux d'immobilisation par rapport à celui observé dans des tubes non agités.

## FIÈVRE Q ET BRUCELLOSE LES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES CROISÉES NE SONT PAS DUES A UN ANTIGÈNE COMMUN

par GÉRARD RENOUX et JACQUES MAURIN.

(Institut Pasteur de Tunis.)

« Il importe également de poursuivre les études pour déterminer l'importance éventuelle des réactions croisées dues à la fièvre Q, bien qu'il convienne de ne pas oublier que les deux infections peuvent coexister » [1].

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons entrepris de rechercher sur 798 sérums humains ou animaux les anticorps spécifiques pour *Brucella* et pour *Coxiella burneti*.

708 sérums sont obtenus au cours d'enquêtes épidémiologiques sur la brucellose et la fièvre Q en Tunisie [2, 3] (1), ils se répartissent en 129 sérums humains, 52 sérums bovins, 395 sérums caprins, 132 sérums ovins ; les 90 autres sérums sont fournis par des cobayes ou des mérions (*Meriones shawi*) normaux ou expérimentalement infectés.

Le séro-diagnostic de la brucellose est pratiqué selon la technique habituelle en utilisant un antigène microbien (souche *Br. suis* S.6) préparé à partir de colonies « lisses », formolé et étalonné par le Sérum Etalon International de l'OIE/OMS (titre final ++ 1/720).

La déviation du complément appliquée à la fièvre Q se fait selon la technique de Kolmer modifiée, telle qu'elle est décrite par l'un de nous [3] (2).

Cette étude ne tient compte que des taux d'agglutination pour la brucellose égaux ou supérieurs à ++ 1/20 et des déviations du complément égales ou supérieures à ++ 1/16 compte tenu des pouvoirs anti-complémentaires.

**Résultats.** — 629 sérums, dont 51 de cobayes, sont négatifs aux deux réactions. Les 172 sérums restant sont positifs à l'une des réactions ou aux deux.

(1) Les résultats d'agglutination ou de déviation du complément donnés dans la présente note ne se peuvent comparer à ceux de nos publications antérieures ; souvent, pour des raisons indépendantes de notre volonté, il n'a pas été possible de pratiquer les deux réactions sur le même sérum.

(2) Nous remercions M. le Dr M. M. Kaplan (vétérinaire en chef, division des Services des Maladies transmissibles, O. M. S.), qui a bien voulu nous procurer l'antigène « fièvre Q » nécessaire.

Le tableau I donne les résultats positifs groupés d'après l'espèce animale en cause. On y voit que, dans le cas de sérums obtenus d'animaux expérimentalement infectés (cobayes ou mérions) qui étaient négatifs antérieurement à toute inoculation, il n'y a pas de réaction croisée entre *Brucella* et *Cox. burneti* ; cependant les taux d'agglutination pour *Brucella* sont élevés, compris entre 1/320 et 1/2 560.

TABEAU I. — Répartition selon l'espèce animale des résultats positifs.

	BRUCELLOSE +	FIÈVRE Q +	LFS DEUX +	TOTAUX
Hommes . . . . .	15	7	2	24
Caprins . . . . .	37	32	2	71
Bovins . . . . .	0	2	0	2
Ovins . . . . .	5	25	6	36
Cobayes . . . . .	33	1	0	34
Mérions . . . . .	5	0	0	5
Totaux . . . . .	95	67	10	172

Le tableau II montre comment se répartissent les résultats selon l'origine géographique (ferme, exploitation, abattoir) des sérums.

On constate qu'il est possible, d'après les résultats, de classer les prélèvements en deux groupes très distincts.

Le premier groupe comprend 567 sérums prélevés dans 9 exploitations différentes. Dans ce groupe, aucun sérum n'est positif à la fois pour la brucellose et la fièvre Q ; 34 sérums seulement, soit 5,9 p. 100, sont positifs au séro-diagnostic pour la brucellose et 33, soit 5,7 p. 100, sont positifs à la réaction de déviation du complément appliquée à la fièvre Q.

Le second groupe est composé de 141 sérums qui proviennent de trois exploitations. En opposition avec le premier groupe, les résultats positifs pour *Brucella* sont plus nombreux : 23 sérums, soit 16,3 p. 100 ; il en est de même pour la fièvre Q : 33 sérums positifs, soit 23,5 p. 100. Or, dans ce groupe, nous avons 10 sérums qui sont positifs à la fois aux deux réactions (7 p. 100). Ces 10 sérums positifs aux deux antigènes viennent :

a) De deux hommes à séro-diagnostic pour *Brucella* positif au 1/1 280 et à déviation du complément pour la fièvre Q au 1/16 ; dans la même exploitation un mouton agglutine *Brucella* à 1/320 et a une déviation du complément positive +++ 1/16 ;

b) Dans une deuxième exploitation, 5 brebis siciliennes ont fourni des sérums qui agglutinent *Brucella* à des taux très faibles, compris entre 1/20 et 1/40 (il y eut cependant des cas humains de brucellose dans l'entourage) ; ces mêmes sérums dévient le complément pour la fièvre Q +++ ou +++ à 1/16 ;

c) Dans la troisième ferme, 2 chèvres alpines : agglutination de *Brucella* 1/640 et 1/1 280, déviation du complément ++ 1/32.

TABLEAU II. — Répartition des résultats selon l'origine géographique.

ÉTABLISSEMENT	SÉRUMS				
	Aux deux —	<i>Brucella</i> +	Fièvre Q +	Les deux +	Totaux
S.T. . . . .	64	4	3	0	71
Abattoirs T. . . . .	54	0	4	0	58
Abattoirs B. . . . .	26	1	2	0	29
I P. (moutons) . . . . .	7	0	0	0	7
Hôpital. . . . .	1	1	0	0	2
Ain S.S. . . . .	49	0	4	0	53
S. . . . .	52	0	0	0	52
Oued el A. . . . .	185	9	20	0	214
Kh. . . . .	62	19	0	0	81
Teb. . . . .	46	9	27	3	85
Dj. M. . . . .	17	5	4	2	28
Dj. A. . . . .	12	9	2	5	28
Totaux . . . . .	575	57	66	10	708

Il ressort clairement de ce tableau et des pourcentages qui en découlent que la présence simultanée des anticorps spécifiques anti-*Brucella* ou anti-*Cox. burneti* n'existe, pour les sérums que nous avons examinés, que si dans l'exploitation (ferme, troupeau, abattoir) il y a, en même temps, des animaux qui ont une réaction de Wright positive et des animaux qui présentent une déviation du complément positive à la fièvre Q.

Bien plus, il semble que ces réactions simultanées aux deux antigènes ne soient possibles que si le pourcentage des animaux réagissant à l'un ou l'autre antigène est suffisamment élevé.

Cette constatation, jointe au fait que les animaux artificiellement infectés par *Br. melitensis* n'ont pas, malgré des titres d'agglutinines élevés, d'anticorps déviant le complément en présence d'antigène coxiellien, nous incline à penser que la présence simultanée des deux anticorps dans un sérum est due, non pas à un antigène commun aux deux microbes, mais à une double infection de l'animal.

*Discussion.* — Quelques auteurs avaient cru pouvoir émettre l'hypothèse de l'existence de réactions croisées entre *Brucella* et *Coxiella*. Nous pensons que les résultats apportés ici sont suffisamment clairs pour permettre d'abandonner cette opinion. Nos résultats corroborent ceux de Lennette et coll. [4], qui concluent de l'examen de 451 sérums, avec un cas seulement de réaction positive avec les deux antigènes, à l'absence de fraction antigénique commune entre *Coxiella burneti* et les *Brucella*.

La coexistence possible des deux infections, dont l'une peut être latente ou subclinique, chez les animaux ou chez les hommes (bergers, vétérinaires, employés d'abattoirs ou d'usines de conserves) vivant en contact avec les animaux peut rendre difficile le diagnostic exact de l'affection dont souffre l'individu considéré : Meyer et Eddie [5] ont, par quelques exemples, montré à quel point ce diagnostic différentiel

par les techniques de laboratoire est parfois délicat. La pratique de cultures, la répétition des examens de laboratoire réussissent toujours à lever cette difficulté.

*Conclusions.* — L'hypothèse a pu, un moment, être soulevée de l'existence de fractions antigéniques communes entre *Brucella* et *Cox. burneti*. Les réactions que nous avons pratiquées montrent que cette hypothèse n'est, sans doute, pas valable, que les animaux artificiellement infectés ne montrent pas de telles réactions croisées, que les animaux naturellement infectés n'en peuvent montrer que si dans le troupeau auquel ils appartiennent il existe un nombre suffisant d'autres animaux infectés par l'un et l'autre microbe.

*Résumé.* — Nous avons pratiqué un sérodiagnostic pour la brucellose et une déviation du complément pour la fièvre Q sur 798 sérums humains ou animaux, les sérums animaux provenant d'animaux naturellement ou artificiellement infectés. Nous n'observons jamais de réactions croisées *Brucella-Coxiella* chez les animaux infectés au laboratoire. Ces réactions croisées ne s'observent dans la nature que si, dans le même troupeau, il existe un fort pourcentage d'animaux infectés par l'un et l'autre microbe.

Ces résultats permettent de dire qu'il n'existe pas, au moins décelable par les techniques employées, de fraction antigénique commune entre *Brucella* et *Coxiella*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Rapport de la 1<sup>re</sup> Session du Groupe d'Experts O. M. S./F. A. O. de la Brucellose. *Rapports Techniques O. M. S.*, 1953, n° 67.
- [2] J. MAURIN. *Ces Annales*, 1954, **86**, 69.
- [3] G. RENOUX et G. CORDIER. *Tunisie Méd.*, 1953, **41**, 653.
- [4] E. H. LENNETTE, W. H. CLARK et F. W. JENSEN. *Am. J. publ. Health*, 1952, **42**, 12.
- [5] K. F. MEYER et B. EDDIE. *Calif. Med.*, 1949, **70**, n° 4.

## ETUDE A L'AIDE DU <sup>32</sup>P DE L'ACCUMULATION DES ACIDES NUCLEIQUES CHEZ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET *SALMONELLA ENTERITIDIS* RÉSISTANTS ET SENSIBLES A LA STREPTOMYCINE.

par M. BELJANSKI et J. GUELFJ.

(Institut Pasteur, Laboratoire de Chimie Biologique,  
Laboratoire de Physique Médicale de la Faculté de Médecine de Paris  
[professeur STROHL]  
et Laboratoire d'Isotopes de l'Institut G.-Roussy [professeur BUGNARD].)

En faisant proliférer quelques souches bactériennes streptomycino-sensibles et streptomycino-résistantes sur milieu gélosé, nous avons



montré [4] que des souches résistantes à la streptomycine accumulaient notablement plus d'acide ribonucléique (certaines accumulaient également de l'acide désoxyribonucléique [2, 10]), que les souches sensibles de mêmes espèces. À l'aide du phosphore radioactif ( $\text{Na}_2\text{HP}^*\text{O}_4$ ) nous avons suivi l'accumulation des acides nucléiques par nos souches bactériennes. Les résultats obtenus sont présentés dans ce travail.

Plusieurs auteurs [3, 4, 5, 6] ont déjà étudié l'assimilation du  $^{32}\text{P}$  sous forme d'ions phosphoriques, par les « resting bacteria » et par les bactéries en prolifération, ainsi que son incorporation dans les constituants de la cellule bactérienne. L'effet létal des radiations  $\beta$  émises par ce radioélément fut également observé. Ces études ont uniquement porté sur les souches bactériennes sensibles à des antibiotiques.

Sans tenir compte de l'effet létal éventuel du  $^{32}\text{P}$ , nous avons suivi l'assimilation du phosphore radioactif par les bactéries sensibles et résistantes à la streptomycine et son incorporation dans les acides nucléiques de ces souches.

*Conditions expérimentales.* — Deux espèces bactériennes furent utilisées pour notre travail : *Staphylococcus aureus* n° 133 et *Salmonella enteritidis* (var. Danysz). Les souches résistantes à 4 000  $\mu\text{g}$  de streptomycine/ml furent obtenues par passages successifs de souches sensibles en milieu de culture additionné de doses croissantes d'antibiotique.

Aux bactéries sensibles et résistantes, ensemencées sur milieu gélosé dans des boîtes de Roux [4], nous avons ajouté du phosphate de sodium marqué par le  $^{32}\text{P}$  (période 14,3 jours, rayonnement  $\beta$  d'énergie moyenne de 1,69 Mev). La concentration de  $^{32}\text{P}$  était de 0,24 mc/ml pour *Salmonella* et de 0,43 mc/ml pour *Staphylococcus* (1). La solution de phosphore radioactif ne contenait que des traces infimes de différents éléments radioactifs. Les bactéries furent récoltées après une heure d'incubation (début de la phase exponentielle de prolifération) et à la vingt-quatrième heure, centrifugées, lavées deux fois à l'eau distillée et mises en suspension dans un faible volume d'eau distillée. Les acides nucléiques furent extraits avec de l'acide trichloracétique à chaud selon Schneider [7]. Les mesures de radioactivité ont été faites d'une part sur les bactéries lavées, et d'autre part sur l'extrait trichloracétique à chaud, après évaporation à l'étuve. Le compteur G. M. fut utilisé. Son mouvement propre était de l'ordre de 10 impulsions par minute.

*Résultats.* — Nos résultats sont exprimés en impulsions/minute pour 1 mg d'azote total microbien (tableau).

Des souches streptomycino-résistantes accumulent à certaines périodes de leur prolifération plus de  $^{32}\text{P}$  que les souches sensibles de mêmes espèces. L'extrait trichloracétique à chaud des souches résistantes est plus riche en phosphore radioactif que celui des souches sensibles. Il est également plus riche en acides nucléiques, ce qui est confirmé par les dosages classiques de ces acides [10].

Dans les conditions de nos expériences, au début de la phase exponentielle de prolifération, 30 p. 100 environ du  $^{32}\text{P}$  assimilé par les

(1) Bonét-Maury et Walen [9] ont constaté que la vitesse de prolifération de *B. coli* n'est pas modifiée en présence d'une mc de  $^{32}\text{P}$  par millilitre de milieu de culture.

ESPÈCES BACTÉRIENNES	SOUCHES	BACTÉRIES LAVÉES		ACIDES NUCLÉIQUES (extrait trichloracétique à chaud)	
		1 h.	24 h.	1 h.	24 h.
<i>Staphylococcus aureus</i> , n° 133.	Sensible.	40 300	2 500	2 800	1 300
	Résistante.	41 400	4 500	3 300	2 300
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant G) [8.]	Sensible.	44 500	9 500	3 500	5 500
	Résistante.	46 500	17 000	6 000	8 500

bactéries, se trouvent incorporés dans les acides nucléiques, et 50 p. 100 à la vingt-quatrième heure. D'après Bonét-Maury et Dey-sine [11], le  $^{32}\text{P}$  ajouté à la concentration de 1 mc/ml à une culture de *B. coli* en milieu liquide se fixe surtout à la surface des bactéries prélevées à la vingt-quatrième heure de leur prolifération. Pour Labaw et ses coll. [12] au contraire, le  $^{32}\text{P}$  est utilisé quantitativement par les bactéries survivantes pendant la synthèse des acides nucléiques. Les résultats de Sternberg et Podoski [13] montrent que le  $^{32}\text{P}$  ajouté sous forme minérale à une culture de *Mycobacterium phlei*, n'est pas adsorbé à la surface des bactéries, mais incorporé dans les différents constituants phosphorés de la cellule bactérienne. Nos résultats montrent que le  $^{32}\text{P}$  n'est pas principalement fixé à la surface bactérienne, car, à la vingt-quatrième heure de prolifération, 50 p. 100 de ce radioélément se trouvent incorporés dans les acides nucléiques.

*Conclusions.* — A l'aide du  $^{32}\text{P}$  nous avons suivi l'accumulation d'acides nucléiques chez les souches de *Salmonella enteritidis* et de *Staphylococcus aureus*, sensibles et résistantes à la streptomycine. Les souches résistantes accumulent à certaines périodes de leur prolifération plus de  $^{32}\text{P}$  que les souches sensibles. Elles sont plus riches en acides nucléiques, ainsi que nous l'avons contrôlé par les dosages chimiques des acides nucléiques. La quantité de  $^{32}\text{P}$  incorporé dans les acides nucléiques est d'environ 50 p. 100 de la quantité totale de  $^{32}\text{P}$  fixé par les bactéries à la vingt-quatrième heure de leur prolifération.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BELJANSKI. Thèse doctorat ès sciences, 1951, Paris, éd. Arnette.
- [2] M. BELJANSKI et M. GRUMBACH. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2111.
- [3] CL. H. WILLIAMS et coll. *J. Bact.*, 1940, **39**, 19.
- [4] C. F. SCHMIDT. *J. Bact.*, 1948, **55**, 705.
- [5] M. LINDAWER. *Naturwiss.*, 1951, **38**, 307.
- [6] F. E. CLARK et C. A. J. GORING. *J. Bact.*, 1951, **62**, 352.
- [7] SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 213.
- [8] J. SERVANT. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 894.
- [9] P. BONÉT-MAURY et R. WALÉN. *Ces Annales*, 1945, **71**, 495.

- [10] M. BELJANSKI. Ces *Annales*, 1953, **85**, 463.  
 [11] P. BONÉT-MAURY et A. DEYSINE. Ces *Annales*, 1953, **84**, 1052.  
 [12] LABAW et coll. *J. Bact.*, 1950, **59**, 251.  
 [13] J. STERNBERG et MARIE-OLGA PODOSKI. Ces *Annales*, 1953, **84**, 853.

## ÉTUDE D'ESPÈCES ET DE VARIÉTÉS NOUVELLES D'ACHROMOBACTER ISOLÉES DU MILIEU MARIN

par JEAN BRISOU.

(Institut de Biologie de Cannes. Directeur : E. FOUREST.)

Après avoir fait le tableau récapitulatif complet de la famille des *Pseudomonadaceae*, et spécialement du genre *Achromobacter*, nous n'avons pas pu y trouver les correspondants de trois bactéries à Gram-négatif assez voisines, isolées de l'eau de mer ou de coquillages. Voici la description de ces germes et les épithètes proposées :

1° *Achromobacter grypheae* (Moureau et Cougoureux), J. Brisou, 1953.

Syn : *Bacterium grypheae arcachonensis*, Moureau et Cougoureux, 1946. Cette espèce correspond à un germe dont 6 souches furent étudiées en 1946 par Moureau et Cougoureux [1, 2]. Toutes avaient été isolées d'huîtres provenant du bassin d'Arcachon.

Bâtonnets mobiles, grâce à un cil polaire. Gram-négatifs.

Cultures aisées. Aérobies et anaérobies facultatifs. Se développe entre + 10° et + 40° avec optimum à 37°. pH limites : 4,0 à 8,5 avec optimum à 7,0. Halophile. Vitalité en eau de mer stérile allant jusqu'à dix-sept mois.

Gélatine : lentement liquéfiée. Jamais complètement.

Gélose : cultures abondantes. Non pigmentées. Bords irisés ; bleutées.

Bouillon : trouble homogène. Ondes moirées. Voile léger. Pas d'odeur.

Gélose au sang : culture abondante. Hémolyse partielle.

Bouillon au sang : culture rapide. Hémolyse rapide.

Sérum coagulé : colonies d'abord incolores, puis grisâtres et brunissantes. Une des 6 souches provoqua un début de liquéfaction du milieu.

Blanc d'œuf coagulé : pas d'attaque.

Pomme de terre : culture peu abondante, sans caractère spécial.

Lait tournesolé : inchangé.

Biochimie : nitrates réduits en nitrites. Pas d'indole. Traces d'H<sub>2</sub>S. N'hydrolyse pas l'urée en milieu synthétique. Ne cultive pas sur le citrate de soude (milieu de Koser-Simmons). V. P., négative ; R. M., positif.

Action sur les sucres. Attaque sans gaz : glucose, mannite, maltose, saccharose, lévulose, glycérine et amidon. Sans action sur le lactose, galactose, dulcité, sorbite, adonite, xylose, rhamnose, arabinose et inuline.

Pouvoir pathogène. — Très pathogène pour la souris qui meurt rapidement de septicémie à la suite d'une injection sous-cutanée de

1/2 à 3/4 de centimètre cube d'une culture de vingt-quatre heures. Le cobaye est tué par 1 souche sur 6 (voie péritonéale). Le lapin peut être infecté par voie digestive. Les filtrats de cultures tuent les animaux par toxémie.

Les 6 souches étudiées par Moureau et Cougoureux furent isolées, comme nous l'avons dit, d'un certain nombre de lots d'huîtres en provenance du Bassin d'Arcachon. On vient d'en résumer les caractères principaux d'après la thèse de Cougoureux (1948). Les auteurs renoncèrent en fin de compte à classer ces bactéries qui furent envoyées dans différents laboratoires pour étude. On admit qu'il ne s'agissait pas d'*Enterobacteriaceae*. On écarta l'hypothèse de vibron, etc., et les auteurs proposèrent l'étiquette *Bacterium grypheeae arcachonensis*.

Le nom proposé n'est pas conforme à la taxonomie française qui, dans le genre *Bacterium* n'admet que des espèces à Gram-positif (A.-R. Prévot, 1948), asporulées. La Nomenclature internationale n'autorise pas les étiquettes trinominales. Nous proposons donc pour le germe de Moureau et Cougoureux l'étiquette *Achromobacter grypheeae*.

Ce germe mobile, cultivant aisément, liquéfiant la gélatine, réduisant les nitrates en nitrites, non chromogène, n'ayant aucun rapport antigénique avec les *Enterobacteriaceae*, trouve en effet place dans notre systématique des *Achromobacter* [3, 4] sous le type MNG +, groupe des glucidolytiques. Nous le situons : dans la clé de détermination, immédiatement après *Achromobacter delicatulum* qui, lui, coagule le lait, le peptonise et fermente lentement le lactose.

#### 2° Variété « *cannensis* ».

Nous avons eu l'occasion d'isoler un germe très voisin de celui de Moureau et Cougoureux dans des coquillages provenant d'une station méditerranéenne. Notre bactérie se distingue par une culture positive sur le milieu de Koser-Simmons au citrate de soude et l'absence d'hémolyse. On peut donc la considérer comme une simple variante mineure d'*Achromobacter grypheeae*. Le nom d'*Achromobacter grypheeae*, var. *cannensis*, pourrait convenir.

#### 3° *Achromobacter echinodermis* J. Brisou, 1953.

Il s'agit de bâtonnets très mobiles, assez trapus, extrémités arrondies, coloration bipolaire. Disposition en paires, petits paquets ou éléments isolés. Formes en navette fréquentes. Rares éléments très discrètement incurvés. Gram négatifs.

Aérobiose préférentielle. Les cultures sont plus denses à la surface du bouillon que dans la masse du milieu. Cultive très bien à la température du laboratoire (18-23°).

Gélatine liquéfiée en cinq à six jours. Cette liquéfaction est totale. Dépôt grisâtre au fond des tubes. Très discrète teinte jaune, irrégulière.

Gélose : cultures abondantes, vernissées, luisantes. Certaines souches donnent des colonies visqueuses. Pas de pigment.

Bouillon : culture rapide ; trouble intense en surface. Dépôt visqueux. Voile léger.

Gélose glycinée de Gessard : culture normale sans apparition de pigment.

Lait tournesolé : inchangé.



Gélose au sang : culture extrêmement abondante. Pas d'hémolyse.

Biochimie : nitrates réduits en nitrites. Pas d'indole ni d'H<sub>2</sub>S.

Urée non hydrolysée. R. M., + ; V. P., négative. Cultive lentement (cinq jours) sur le citrate de soude en alcalinisant le milieu.

Action sur les sucres. Attaque sans gaz : glucose, mannite, maltose, glycérine. Sans action sur : dulcité, arabinose, lactose et xylose.

Cette espèce, dont nous avons pu étudier 5 souches isolées d'oursins, ne trouve aucun similaire dans le genre *Vibrio* auquel de très rares formes un peu incurvées pouvaient faire penser. Ses caractères biochimiques sont assez proches de l'espèce *grypheae* ; toutefois, la gélatinolyse, beaucoup plus énergique, complète, l'absence d'hémolyse permettent d'en faire une nouvelle espèce. En raison de son origine nous proposons le nom d'*Achromobacter echinodermis* qui est, comme l'espèce précédente, du type : M N G + glucidolytique.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] M. MOUREAU et R. COUGOUREUX. *Soc. Biol. Bordeaux*, 16 juin 1946.

[2] R. COUGOUREUX. *Thèse Méd.*, Bordeaux, 1947-1948, n° 112.

[3] J. BRISOU. *Ces Annales*, 1953, **84**, 812.

[4] J. BARREAU. *Thèse Méd.*, Bordeaux, 1953.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Influence du cobalt sur la multiplication de *Staphylococcus aureus* et sur l'activité antistaphylococcique de la pénicilline**, par M. FAGUET.

**Anomalies observées au cours du titrage des sérums anti-œdématis**, par M<sup>lles</sup> M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY.

**Isolement et emploi de phages nouveaux pour identifier les souches de staphylocoques pathogènes insensibles aux phages classiques**, par R. WAHL et J. FOUACE.

**Etude comparée du type sérologique, de la sensibilité aux bactériophages et de l'antibiogramme de 201 souches de staphylocoques isolés par prélèvements systématiques chez le nourrisson**, par J. PILLET, J. CALMELS, B. ORTA et G. CHABANIER.

#### ÉLECTION

MM. Béguet, Luteraan, Mamfrin, Morichau-Beauchant, Pangalos, Sannonsens, Virat, M<sup>me</sup> Pavlatou, sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.



## ASSOCIATION INTERNATIONALE DES SOCIÉTÉS DE MICROBIOLOGIE

*Statuts préparés par le Secrétaire général provisoire  
et votés à Rome le 12 septembre 1953  
par l'Assemblée générale du VI<sup>e</sup> Congrès International  
de Microbiologie.*

---

Les microbiologistes des différents pays du monde, réunis à Rome à l'occasion du VI<sup>e</sup> Congrès international de Microbiologie, désireux de contribuer à l'avancement de la recherche scientifique dans le domaine des études microbiologiques et d'aider les diverses Sociétés ou Instituts de Microbiologie existant dans les différents pays, ont décidé de s'unir en une association internationale des Sociétés et Instituts nationaux et d'adopter les statuts suivants, destinés à remplacer les statuts provisoires en vigueur.

ARTICLE PREMIER. — Le nom de l'association est « Association internationale des Sociétés de Microbiologie (AISM) ».

ART. 2. — L'Association a pour but :

- a) d'assurer la continuation des Congrès internationaux de microbiologie et d'organiser toutes autres réunions ou colloques ;
- b) d'encourager la recherche dans le domaine de la microbiologie ;
- c) de favoriser la création de bourses pour permettre aux biologistes des nations participantes de poursuivre leurs études ou leurs recherches à l'étranger ;
- d) d'établir des relations avec toutes les sociétés de microbiologie du monde entier ;
- e) de constituer des commissions internationales s'occupant des questions de nomenclature ou de tous autres sujets adéquats ;
- f) d'établir un contact avec les organismes compétents des Nations Unies.

ART. 3. — Tout pays désirant devenir membre de l'Association devra en faire la demande par l'intermédiaire d'une société de microbiologie ou d'un organisme dépendant d'une société de microbiologie ou, s'il n'existe pas de société de microbiologie, par l'intermédiaire d'une institution scientifique de ce pays.

Il ne sera reconnu à cet effet par le Comité exécutif qu'une seule société ou une seule institution nationale.

ART. 4. — Les sociétés de microbiologie pourront se grouper en organismes régionaux, dans le cadre de l'AISM, si cette disposition s'avère désirable pour les sociétés appartenant à une région déterminée.

ART. 5. — Les organismes de l'Association se composent des délégués nationaux réunis en Assemblée générale et du Comité exécutif ;

a) l'Assemblée générale comprend un à trois délégués au maximum pour chaque pays, mais chaque pays n'a droit qu'à une seule voix.

L'Assemblée générale est dotée de pleins pouvoirs et prend toutes les mesures nécessaires en tout ce qui concerne l'Association ; elle élit le Comité exécutif et approuve le bilan.

Les décisions sont prises à la majorité des membres présents.

L'Assemblée générale siège à l'occasion de chaque Congrès international de microbiologie.

b) Le Comité exécutif comprend un président, deux vice-présidents, un secrétaire général et un trésorier ; il demeure en fonction jusqu'au congrès suivant.

Le Comité exécutif prend les mesures qui résultent des motions votées par l'Assemblée générale, vote le budget, et exerce son activité conformément à l'article 2 ; il soumet le bilan à l'Assemblée générale suivante et est responsable de son activité devant l'Assemblée générale.

Les membres du Comité exécutif peuvent participer par correspondance au vote des résolutions.

ART. 6. — L'Association a son siège au lieu où le Secrétaire général exerce son activité.

L'Association est normalement représentée par le Président ou le Secrétaire général. Tout autre microbiologiste peut, avec l'approbation du Comité exécutif, être désigné pour représenter l'Association.

ART. 7. — L'activité financière de l'Association, y compris les décisions concernant le montant des cotisations, est exercée par le Comité exécutif. Le Comité exécutif peut accepter les dons et les legs.

ART. 8. — Le règlement de l'Association sera établi lors d'une Assemblée générale. Tout pays participant a le droit de proposer des modifications au règlement en les faisant parvenir au Secrétaire général au moins six mois à l'avance.

---

## LIVRES REÇUS

G. E. W. Wolstenholme. — *The spinal cord. Ciba Foundation Symposium.* 1 vol., 300 p., J. A. Churchill Ltd, Londres, 1953.  
Prix : 30 shillings.

Ce volume contient les communications qui ont été présentées au Symposium de la Ciba Foundation tenu en Angleterre, du 26 au 28 février 1952. Toutes les questions concernant la moelle épinière sont envisagées du point de vue anatomique, physiologique et pharmacologique. Après un premier article sur la moelle chez les animaux inférieurs (invertébrés) viennent de nombreux chapitres traitant surtout du fonctionnement normal de la moelle, des propriétés fonda-

mentales et de l'organisation de la cellule nerveuse. La question des phénomènes qui se produisent au niveau des synapses est particulièrement étudiée. Les récentes techniques électro-physiologiques et pharmacologiques ont été employées dans ces recherches. Le livre se termine par un article sur la transmission de l'influx nerveux dans les nerfs des sujets atteints de poliomyélite paralytique, qui semble montrer que, dans un assez fort pourcentage des cas, la stimulation du nerf du membre paralysé provoque encore une certaine réponse, ce qui permettrait d'envisager une réadaptation.

H. T.

**C. W. Carter et R. H. S. Thompson.** — *Biochemistry in relation to Medicine*. 1 vol. 524 p., 36 fig., 1 pl. en couleurs. Longmans, Green et Co, Londres, New York et Toronto, 1952 (2<sup>e</sup> édition), Prix : 30 shillings.

Ce livre est écrit pour les étudiants en médecine. Il présente de façon classique l'étude des trois principaux groupes biochimiques : hydrates de carbone, lipides, protides.

On y trouve aussi exposées, dans des chapitres bien développés, nos connaissances actuelles sur les enzymes, les oxydations biologiques, les vitamines, l'équilibre acido-basique, les électrolytes de l'organisme, les protéines plasmatiques.

D'autres chapitres, plus techniques, sont consacrés aux explorations fonctionnelles de l'estomac, du foie, du pancréas, du rein, et à l'analyse des urines et de la bile. Un chapitre spécial fait le point de nos connaissances biochimiques sur la nutrition.

Chaque chapitre est complété par la description détaillée des techniques d'analyse biochimique les plus courantes. A la fin de l'ouvrage, un Index contient un grand nombre de renseignements pratiques, utiles au travailleur de laboratoire. Enfin, une abondante bibliographie fait de ce livre, à la fois théorique et pratique, un instrument de travail précieux pour l'étudiant comme pour le chercheur.

P. S.

**Premier symposium international sur la lutte contre le pian.** —

*Organisation Mondiale de la Santé : Série de Monographies*, n° 15, iv + 418 pages, 32 pl. Prix : Fr. fr., 1 440 ; Fr. s., 18 ; 22 sh. 6 d ; doll., 4,50. Dépositaire pour la France, Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

Ce volume contient dix-huit des travaux présentés au Premier Symposium international sur la lutte contre le pian, qui s'est réuni à Bangkok (Thaïlande), en mars 1952, ainsi que le résumé de quelques-unes des discussions. Parmi les sujets traités et discutés figurent la biologie du pian, le rôle des antibiotiques dans le traitement de la maladie, la contribution que les institutions internationales peuvent apporter aux gouvernements dans la lutte anti-pianique. Les cinq phases d'un programme de lutte y sont décrites : 1° analyse et délimitation du problème ; 2° élaboration de plans d'opération adaptés aux conditions locales ; 3° démonstrations, enquêtes, formation du personnel ; 4° consolidation des résultats par



l'intégration du programme de lutte antipianique dans les services sanitaires permanents de la région considérée.

L'expérience acquise au cours des campagnes de traitement systématique par la pénicilline-retard, dans divers pays et régions tels que l'Afrique, l'Asie du Sud-Est (Indonésie, Thaïlande), le Brésil, Haïti, les Philippines, illustrent les diverses étapes du programme.

H. T.

**P. Fildes et W. E. van Heyningen.** — *The Nature of Virus Multiplication*, Second Symposium of the Society for General Microbiology, 1 vol. University Press, Cambridge, 1953, 320 p. Prix : 35 shillings.

Notre homologue britannique, la Society for General Microbiology, a tenu au mois d'avril 1952, à l'Université d'Oxford, un colloque sur la nature de la multiplication des virus. Ce sont les travaux présentés à ce colloque, ainsi que l'essentiel des discussions qui les ont accompagnés, qui sont réunis dans ce volume sous la direction de P. Fildes et W. E. van Heyningen.

On y trouve 16 chapitres débutant chacun par un rapport original et présentant la somme des notions classiques et des théories nouvelles sur la multiplication des virus.

Le problème général a été abordé sous tous les angles, aussi bien celui du problème de la synthèse des protéines que du rôle des acides nucléiques, aussi bien pour les virus des vertébrés que ceux des insectes, des plantes ou des bactéries, aussi bien par les méthodes radiobiologiques que par celles de la chimie ou de la statistique. Une place importante a été réservée aux bactériophages, en particulier avec les articles de Luria, Boyd, Lwoff, Latarjet, Fildes et coll., considérés comme modèles d'étude de la multiplication et comme se prêtant plus facilement à l'analyse.

On a su ne retenir des discussions qui suivirent l'exposé des rapports que les remarques les plus pertinentes et les rédacteurs ont justement admis la possibilité de modifications ou d'additions faites lors de la révision des épreuves. C'est dire que ce livre présente l'aspect le plus actuel et le plus complet d'une question essentielle dans l'étude des virus et que si certains chapitres sont appelés, de par la nature même du sujet qu'ils traitent, à vieillir rapidement, l'ensemble de l'ouvrage n'en constitue pas moins une œuvre fondamentale à laquelle devront se référer tous ceux qui travaillent aujourd'hui le problème des virus.

P. L.

**Cecil E. Hall.** — *Introduction to Electron Microscopy*, McGraw-Hill Publishing Company Ltd. London, 1953, 451 p.

La technique du microscope électronique a suffisamment progressé depuis dix ans pour que cet instrument ait conquis les laboratoires biologiques et soit devenu un auxiliaire indispensable de la recherche. Il n'est malheureusement pas encore question de le mettre entre toutes les mains, car aussi bien le réglage, la manipulation et l'entre-

tien d'un microscope électronique, que la préparation des objets, leur traitement et leur examen restent d'une technique délicate et qui demande une formation particulière. C'est à aider cette formation que répond le livre de Hall.

On y trouvera en effet les éléments d'optique électronique à la fois théorique et pratique, l'étude du déplacement des électrons dans l'espace et sous l'influence des champs électrostatiques ou électromagnétiques et la théorie des lentilles, qui donneront les bases physiques indispensables au lecteur pour aborder l'étude de la microscopie électronique. Les appareils eux-mêmes sont décrits minutieusement dans leur principe et, pour quelques-uns, dans leurs détails. L'étude des phénomènes intervenant dans la formation des images et dans les altérations qui leur sont apportées par les aberrations, la diffraction, l'absorption ou la diffusion des électrons, sont décrites avec toute la minutie nécessaire et l'analyse théorique qu'elles comportent. Enfin, les techniques de préparation des objets, d'ombrage par vaporisation métallique, d'obtention des répliques, celles des coupes histologiques ultrafines appliquées à l'examen des objets biologiques, sont exposées avec assez de détails pour permettre au lecteur une initiation aux méthodes décrites. Des exemples de résultats obtenus dans les différents champs d'application du microscope électronique terminent le volume.

Dans l'ensemble, ce livre est d'une parfaite présentation, les illustrations sont nombreuses, les schémas clairs et démonstratifs, les formules mathématiques sont réduites à l'essentiel et permettent néanmoins des calculs précis comme ceux des caractéristiques des lentilles, les techniques biologiques sont mieux qu'esquissées, la bibliographie de chaque chapitre est assez complète, au moins en ce qui concerne les travaux de langue anglaise.

Parmi les différents chapitres, c'est évidemment celui ayant trait aux applications qui vieillira le plus vite et ce sont ceux consacrés au réglage du microscope, à la correction des lentilles, à l'élaboration des principales méthodes pratiques (ombrage, etc.) qui rencontreront le plus de succès auprès des utilisateurs.

De tous les livres parus jusqu'à ce jour, c'est certainement celui qui traite le mieux la microscopie électronique envisagée sous l'angle pratique, et à ce titre il a sa place dans la bibliothèque de tout laboratoire de microscopie électronique.

P. L.

**J. Priestman et F. C. G. Edwards.** — *Aids to qualitative pharmaceutical analysis*. 1 vol., 144 p., Baillière, Tindall et Cox, édit., Londres, 1953, Prix : 6 shillings.

Nouveau petit manuel de cette collection, destiné aux étudiants en pharmacie, et qui étudie la question du point de vue de la chimie organique et du point de vue de la chimie minérale. Un chapitre est consacré à la composition des réactifs et à leur emploi. Une liste alphabétique de tous les corps cités dans le livre permet de retrouver facilement les chapitres ou paragraphes qui les concernent.

H. T.



*Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures.* 9<sup>e</sup> édition. 1 vol. 350 p., Difco Laboratory Inc., Detroit, Michigan, U. S. A., édit.

Cette 9<sup>e</sup> édition (la première avait paru en 1927) a été complètement revue et écrite de nouveau pour la plupart des chapitres. C'est, en particulier, la première qui comprenne les réactifs employés dans la préparation des milieux pour la culture des tissus *in vitro*. Comme les précédentes, elle sera précieuse pour tous les microbiologistes.

H. T.

**Lord Horder.** — *Fifty years of Medicine.* 1 vol., 70 p., G. Duckworth et C<sup>ie</sup>, édit., Londres, 1953. Prix : 5 shillings.

L'auteur a reproduit, en les complétant, les trois conférences qu'il avait faites en 1952 au Royal Institute of Public Health and Hygiene. Il étudie les progrès de la médecine scientifique, née au xix<sup>e</sup> siècle, son état actuel et ses perspectives d'avenir. Lui-même a apporté une contribution personnelle aux travaux qui, au cours de ces cinquante dernières années, ont fait progresser la médecine.

H. T.

*Lectures on the scientific basis of Medicine, tome I.* 1 vol., 396 p., 6 pl. hors-texte. The Athlone Press, édit. 1953. Prix : 30 shillings.

Le volume contient 18 des 39 conférences qui ont été faites au cours de l'hiver 1951-1952 par différents spécialistes de chacune des questions traitées. Ce cycle de conférences a été organisé par la Postgraduate Medical Federation et doit se renouveler tous les ans. Le but de l'entreprise est de donner aux jeunes médecins une vue d'ensemble des progrès récemment réalisés dans les différentes branches de la médecine, afin de leur éviter des recherches auxquelles ils seraient obligés de consacrer beaucoup de temps. Les questions traitées dans le présent volume concernent les hormones, les mécanismes du cerveau, la pression sanguine, l'immunité dans les maladies à bactéries et les maladies à virus, la coagulation du sang, les problèmes de la nutrition, etc.

H. T.

*Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie.* Vol. VI. Congrès de Sanremo, 24-28 septembre 1952. 1 vol., 698 p. Stab. Grafico F. Lega, Faenza, édit., 1953.

Comptes rendus *in extenso* de toutes les communications qui ont été présentées à ce Congrès, suivies de leur bibliographie.

H. T.

---

Le Gérant : G. MASSON.